

RBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

A RBAC é classificada como Qualis Internacional A em Farmácia.



Consolidando o Futuro das
Análises Clínicas no Brasil

1

VOLUME 40
2008

SUMÁRIO

A vulnerabilidade às DST em região com intensa prostituição e turismo sexual de Natal/RN.....	3
<i>Luciana Vilar de Sales Rocha, Veruska Cassandra Diniz, Jarine Torres de Araújo, Cinthia Kalline Rolim, André Franco Ribeiro Dantas, Hênio Ferreira de Miranda, Francisco Ivo Cavalcante & Ana Conceição Ribeiro Dantas Saturnino</i>	
The vulnerability to the STD in region with intense prostitution and sexual tourism of Natal/RN	
Frequência de cepas produtoras de enzima beta lactamase de espectro expandido (ESBL) e perfil de susceptibilidade de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em hemoculturas no berçário de um hospital de Fortaleza...	7
<i>Everardo Albuquerque Menezes, Angélica Menon de Alencar, Francisco Afrânio Cunha, Maria Rozellê Ferreira Ângelo, Maria Núbia Cavalcante Salviano & Inácio Regis Nascimento Oliveira</i>	
Producing frequency strain of extended spectrum beta lactamase enzyme (ESBL) and profile of susceptibility of <i>Klebsiella pneumoniae</i> in bloods cultures in the nursery of a hospital of Fortaleza	
Estudo epidemiológico das dermatofitoses em instituições públicas da cidade de Barretos, São Paulo, Brasil...	13
<i>Cátia Rezende, Graziela Porsani Borsari, Alessandra Cristina Fontes da Silva & Fernanda Regina Cavalcanti</i>	
Dermatophytosis epidemiologic study in public institution of Barretos city, São Paulo, Brazil	
A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão.....	17
<i>Analara Köch & Fabiana Michelsen de Andrade</i>	
The use of molecular biology techniques in forensic genetics: a review	
Comparação entre as células-tronco de sangue de cordão umbilical de neonatos prematuros e nascidos a termo: uma revisão.....	25
<i>Thais L. Gomes & Patricia Pranke</i>	
Comparison between preterm and full-term newborn umbilical cord blood stem cells: a review	
Prevalência de Infecções Nosocomiais Provocadas por <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina (M.R.S.A.), no Hospital Universitário Regional de Maringá.....	31
<i>Luizemi Bianchi Gualda de Souza & Beatriz de Barros Figueiredo</i>	
Prevalence of Nosocomial Infections Provoked by Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (M.R.S.A.), in the Regional University Hospital of Maringá	
Prevalência de microrganismos em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no laboratório de análises clínicas da Universidade Paranaense – Umuarama – PR.....	35
<i>Erlido Vicente Muller, Dayani Fernanda dos Santos & Nelton Anderson Bespalez Corrêa</i>	
Prevalence of microorganisms in urinary tract infections of patients attended in the clinical analysis of the Paranaense University – Umuarama – PR	
Determinação do intervalo de referência para o volume plaquetário médio (VPM) utilizando o analisador hematológico Pentra 120 ABX.....	39
<i>Mariela Granero Farias & Suzane Dal Bó</i>	
Determining the reference interval for the mean platelet volume (MPV) making use of the hematology analyzer Pentra 120 ABX	
Gestação e papilomavírus humano: influência da idade materna, período gestacional, número de gestações e achados microbiológicos.....	43
<i>Luiz Mário da Silva Silveira; Roxana de Carvalho Veras; América de Lourdes Nogueira da Cruz & Manuel dos Santos Faria</i>	
Pregnancy and human papillomavirus: influence of maternal age, gestational period, number of pregnancies and microbiological findings	
O Exame do Sêmen na Infertilidade Masculina: V- Exame Microbiológico.....	49
<i>Fernando Tadeu Andrade-Rocha</i>	
The microbiological examination of the semen to evaluate male infertility	
Panorama da Hepatite C no estado de Santa Catarina e na cidade de Florianópolis.....	57
<i>Sabrina Gonçalves, Elaine Nunes Daminelli, Celso Spada & Patricia Haas</i>	
An overview of Hepatitis C in the state of Santa Catarina and in the city of Florianópolis	
Análise molecular de estirpes de <i>Escherichia coli</i> isoladas a partir de amostras de urina de pacientes ambulatoriais por RFLP da região intergênia 16s-23s.....	61
<i>Gisele Kleine Neves, Iriane Eger Mangrich, Cassia Maria Zoccoli, Rafael Cancian & Darlene Camati Persuhn</i>	
Molecular analysis based on intergenic 16s-23s RFLP of <i>Escherichia coli</i> strains obtained from urine samples of ambulatory patients	
<i>Candida</i> sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais.....	65
<i>Maria Eduarda Maluché & Jairo Ivo dos Santos</i>	
<i>Candida</i> sp. and nosocomial infections: epidemiological and laboratory aspects	
A citopatologia uretral como ferramenta na detecção de efeito citopático do papilomavírus humano (HPV) em pacientes com peniscopia característica de infecção viral.....	69
<i>Hellana de Araújo Silva; Luiz Mário da Silva Silveira; Glauciene Serafim França & Ailce de Cássia Soares Santos Rego</i>	
The role of urethral cytopathology in detection of cytopathic features of Human Papillomavirus (HPV) in patients with peniscopy characteristic of viral infection	
Manutenção de leveduras por congelamento a - 20°C.....	73
<i>Jaqueline Otero SILVA, Patricia Pereira COSTA & Silvia Helena Chinarelli RECHE</i>	
Yeasts maintenance for freezing at - 20°C	



Prezados colegas,

Começamos 2008 com força total para que cada participante dos nossos eventos programados para este ano sinta que seu investimento realmente tenha valido a pena.

Por isso lhes garanto: cada evento será um sucesso cada vez maior.

No 1º Congresso Sul Brasileiro de Análises Clínicas que ocorrerá em Florianópolis, no período de 30 de abril a 03 de maio, contaremos com um importante número de expositores e palestrantes, abrilhantando o evento regional e trazendo para a Região Sul os preparativos para o WorldLab IFCC 2008.

Da mesma forma, em agosto teremos o tradicional Congresso Regional de Análises Clínicas do Centro-Oeste, o 9º CRACCO, que contará com expositores dispostos a levar o que existe de mais atualizado no mercado nacional. Para os participantes, além da oportunidade de fazer bons negócios, teremos palestras atualizadas com professores de renome na região e no mercado nacional.

O ponto alto deste ano será, sem dúvida, o WorldLab IFCC 2008, onde contaremos com o que existe de mais moderno na área laboratorial no mundo, tanto por parte dos expositores, que trarão novidades internacionais, quanto da parte dos palestrantes que trarão o que existe de mais moderno no conhecimento científico.

Fato é que teremos, entre nós, dois conferencistas que já receberam Prêmios Nobel, o que, por si só, já será uma honraria importante para a SBAC.

Mas não estamos preocupados apenas em agradar os participantes internacionais, já em bom número; queremos fazer deste realmente o maior congresso já realizado no Brasil.

Nossos focos de ação estão voltados também para você, participante nacional, e nos preocupamos em colocar o máximo de palestras com tradução simultânea para que vocês possam acompanhar tudo da melhor forma.

Bom, a convocação está feita...

Contamos com vocês. Participem. Estamos, a cada dia, Consolidando o Futuro das Análises Clínicas no Brasil. E você é parte importante deste processo.

Um abraço a todos,

Ulisses Tuma,
Presidente da SBAC

Diretor Responsável

Prof. Mateus Mandu de Souza

Vice-Diretor

Prof. João Ciribelli Guimarães

Este periódico é órgão oficial da SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS – SBAC, e destinado à divulgação de trabalhos científicos, observações pessoais, informações de interesse geral em defesa da classe dos que militam no ramo das análises clínicas, constituindo elo de união dos profissionais e fonte de estímulo na aquisição de conhecimentos que melhor os capacitem no desempenho da profissão, em benefício da comunidade.

Assinatura Anual: R\$ 105,00
Exterior US\$ 50.

Indexada no LILACS – www.bireme.br
http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislnd.exe/iah/online
Portão periódicos – www.periodicos.capes.gov.br
Classificação CAPES: Internacional A - Farmácia,
Nacional B - Medicina I e II, Multidisciplinar e
Saúde Coletiva.
Farmácia, Medicina, Odontologia
www.capes.gov.br - http://qualis.capes.gov.br/
webqualis/ConsultaPeriodicos.faces

Tiragem: 4.700 exemplares

Bioquímica – Dr. Álvaro Largura (PR), Dr. Marcelo Quintão Mendes (MG), Dr. Geraldo Pichet (PR), Dra. Marileia Scartezini (PR), Dr. Arício Treitinger (SC), Dr. Paulo Mocarelli (ITA), Dra. Dulcinea Saes Parra Abdalla (SP), Dr. Ary Henrique Filho (Urinálise) (GO), Dr. Daniel Mazziota (AR), Dr. Antenor Henrique Pinto Pedrazzi (SP), Dra. Jane Maciel Almeida Baptista (MG), Dra. Marinez Oliveira Sousa (MG), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ)

Citologia – Dr. Ely Chaves (PB), Dra. Rita Maria Amparo Bacelar Palhano (MA), Dr. Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Dr. André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ), Dr. Carlos Eduardo Queiroz Lima (PE), Dra. Rita Gorete Amaral (GO), Dr. Alexandre Onofre (SE), Dra. Sílvia Helena Rabelo Guimarães (GO)

Controle de Qualidade – Dr. José Abol Corrêa (RJ), Dr. Luís Fernando Barcelos (RS)

Endocrinologia – Dr. Carlos Alberto Camargo (SP), Dra. Ana Maria Menezes (SP)

Toxicologia – Dra. Regina Helena Queiroz (SP), Dra. Maria da Graça Almeida (RN)

Microbiologia – Dr. Antônio Márcio Lopes (MG), Dr. Mateus Mandu de Souza (RJ), Dr. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Estevão José Colnago (RJ), Dr. Amauri Simonetti (RS), Dra. Cassia Maria Zoccoli (SC), Dra. Carmen Paz Oplustil (SP)

Imunologia – Dr. Paulo Jaconi Saraiva (RS), Dr. Antônio Walter Ferreira (SP), Dra. Adelaide José Vaz (SP)

Parasitologia – Dr. Antônio Pedro Soares (MG), Dr. Paulo S. Minami (SP), Dr. Geraldo Atilio De Carli (RS), Dr. Jerolino Lopes Aquino (MT)

Micologia – Dr. Paulo Murillo Neufeld (RJ), Dra. Maria José Gianini (SP), Dra. Regina Célia Candido (SP)

Biologia Molecular – Dr. Mario Hiroyuki Hirata (SP), Dr. Rosário Dominguez Crespo Hirata (SP), Dr. Marcelo Mascarenhas (RS), Dra. Kelly Melo (SP)

Hematologia – Dr. Jorge Fernando Teixeira Soares (RJ), Dr. Marcos Kneip Fleury (RJ), Dr. Celso Spada (SC), Dr. Paulo César Naoum (SP), Dr. Julio Cezar Merlin (PR), Dr. Paulo Henrique da Silva (PR)

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS®

FILIAÇÃO
IFCC - INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE
COLABIOCLI - CONFEDERAÇÃO LATINOAMERICANA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA
ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS
CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE
AMN - ASOCIACION MERCOSUR DE NORMALIZACION
ONA - ORGANIZAÇÃO NACIONAL DE ACREDITAÇÃO
Rua Vicente Licínio, 99 • Tel.: (0XX21) 2187-0800 • Fax: (0XX21) 2187-0805
Rio de Janeiro • RJ • 20270-902
Home page: www.sbac.org.br • e-mail: geral@sbac.org.br

Diretoria Presidente

Dr. Ulisses Tuma (GO)

Vice-Presidente

Dr. Irineu Keiserman Grinberg (RS)

Secretária Geral

D^{ra} Elvira Maria Loureiro Colnago (RJ)

Secretário

Dr. Celso Rubens Loques Mendonça (RJ)

Tesoureiro

Dr. Estevão José Colnago (RJ)

Tesoureiro Adjunto

Dr. Francisco Edison Pacifici Guimarães (RJ)

MEMBROS DO CONSELHO FISCAL

Titulares: Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dra. Geruza Maria Caldas Maia (RN), Dr. Tarcísio de Oliveira Moura (PE)
Suplente: Dr. Homero Jackson de Jesus Lopes (MG), Dr. José Ronaldo Cardoso (MG) e Dr. Marcelo Pilonetto (PR)

COMISSÃO DE NORMAS E HABILITAÇÃO

Coordenação: Dra. Elvira Maria Loureiro Colnago (RJ)
Membros: Prof. Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro (SP), Prof. Durval Mazzei Nogueira (SP), Dr. Estevão José Colnago (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Luiz Fernando Barcelos (RS), Prof. Mateus Mandu de Souza (RJ), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ), Prof. Raimundo Diogo Machado (RJ), Dr. Willy Carlos Jung (SC)

DIRETOR DE CURSOS

Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ)

REPRESENTANTES:

IFCC: Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Ulisses Tuma (GO)
COLABIOCLI: Dr. Ulisses Tuma (GO), Dr. José Abol Corrêa (RJ)
AMN - Associação Mercosur de Normalização:
Dr. Irineu Keiserman Grinberg (RS), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Dr. Luiz Fernando Barcelos (RS) e Dr. Mateus Mandu de Souza (RJ)
ONA – Organização Nacional de Acreditação:
Dr. José Abol Corrêa (RJ)
Governamental: Dr. Ulisses Tuma (GO), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Dr. Irineu Keiserman Grinberg (RS)

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE

Coordenação: Dr. José Abol Corrêa (RJ)

Assessores: Dr. André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ), Dr. Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Dra. Elvira Maira Loureiro Colnago (RJ), Dr. Estevão José Colnago (RJ), Dr. Francisco Edison Pacifici Guimarães (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Marcos Kneip Fleury (RJ), Dra. Maria Isabel Figueiras Neufeld (RJ), Prof. Mateus Mandu de Souza (RJ), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ), Dr. Paulo Murillo Neufeld (RJ), Dra. Thais Lisboa Machado (RJ)

COMISSÃO DE CONGRESSOS

Membros: Dr. Álvaro largura (PR), Prof. Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro (SP), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Dr. Tarcísio de Oliveira Moura (PE), Dr. Ulisses Tuma (GO), Dr. Elias José Cury Júnior (GO), Dra. Maria Ordália Ferro Barbosa (GO)

INFORMATIVO DA SBAC

Membros: Dr. Antônio Jaguaribe Neto (RJ), Dr. Estevão José Colnago (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Prof. Raimundo Diogo Machado (RJ), Dr. Willy Carlos Jung (SC)

CONSELHO DELIBERATIVO

Membros Natos: Prof. Ediláudio Luna de Carvalho (PB), Dr. Evanyr Seabra Nogueira (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Prof. Mateus Mandu de Souza (RJ), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ), Dr. Ney Haushahn (RJ), Dr. Willy Carlos Jung (SC), Dr. Francisco Edison Pacifici Guimarães (RJ), Dr. Humberto Marques Tiburcio (MG)

REGIONAIS DA SOCIEDADE

Bahia: Presidente: Dr. Mário Martinelli Júnior - Vice-Presidente: Dr. Petrônio Primo Coêlho - Secretário: Dr. Anderson Lobo Alvim - Tesoureiro: Dr. Luiz Roberto de Carvalho; **Ceará:** Presidente: Dr. Francisco Einstein do Nascimento - Vice-Presidente: Dr. José Antonio Perez Silveira - Secretária: Dra. Maria Guilhermina Jaborandy Rodrigues - Tesoureiro: Dra. Zirlane Castelo Branco Coelho - Tesoureira Adjunta: Dra. Maria Iracema de Aguiar Patrício; **Distrito Federal:** Presidente: Dr. Antônio Alves de Sousa - Vice-Presidente: Dr. Paulo Roberto Sabino Júnior - Secretário: Dr. José Persival Rico - Tesoureiro: Dr. Hélio José de Araújo; **Goias:** Presidente: Dr. Elias José Cury Júnior - Vice-Presidente: Dr. Ulisses Tuma - Secretária: Dra. Cristina Lobo Batista de A. Bastos - Tesoureira: Dra. Maria Ordália Ferro Barbosa; **Minas Gerais:** Presidente: Dr. José Ronaldo Cardoso - Vice-Presidente: Dr. José Alair Couto - Secretário: Dr. Vicente Odail de Souza Espíndola - Tesoureiro: Dr. Glauco de Paulo B. Silveira; **Paraná:** Presidente: Dr. Marcelo Pilonetto - Vice-Presidente: Dr. Paulo Hatschbach - Secretário: Dr. Samuel Ricardo Comar - Tesoureiro: Dr. Luciano André Perini; **Pernambuco:** Presidente: Dr. Jurandi David da Silva - Vice-Presidente: Dr. João Gonçalves Júnior - Secretária: Dra. Maria Amélia Vieira Maciel - Tesoureiro: Dr. José Araújo de Carvalho; **Rio Grande do Norte:** Presidente: Dra. Geruza Maria Caldas Maia - Vice-Presidente: Dra. Lenira da Silva Costa - Secretária Geral: Dra. Andréa Luciana Araújo da C. Fernandes - Secretária: Maria da Conceição Silva Fernandes - Tesoureiro: Dr. Waldenilson Dutra Germano da Silva - Tesoureira Adjunta: Dra. Dóris Cavalcante Huguenin; **Rio Grande do Sul:** Presidente: Dr. Luiz Arno Lauer - Vice-Presidente: Dr. Antônio do Amaral Batista - Conselho Fiscal: D^{ra}. Carmem Pilla e Vera Santa Fé - Suplentes: D^{ra}. Alzira Resende do Carmo Aquino e Dr. Marcello Mascarenhas - Tesoureiro: Dr. Diogo André Pilger

DELEGADOS DA SOCIEDADE

Alagoas: Dr. José Pereira Mendes Júnior; **Amazonas:** Dr. João Avelino Neto; **Espírito Santo:** Dr. Henrique Tommasi Netto; **Maranhão:** Dra. Rita Maria do A. B. Palhano; **Mato Grosso:** Dr. Jerolino Lopes Aquino; **Mato Grosso do Sul:** Dr. Nery Bittner; **Pará:** Dr. Sérgio Luiz Vasconcelos do Vale; **Paraíba:** Dra. Tereza Cristina Davi Marques; **Piauí:** Dr. Glouberg Nobrega dos Santos; **Rondônia/Acre:** Dra. Alba Lucia Cordeiro Alves; **Santa Catarina:** Dr. Caio Roberto Salvinio; **São Paulo:** Dr. Marcos Machado Ferreira; **Sergipe:** Dra. Maria da Conceição L. Oliveira; **Tocantins:** Dr. Francisco Wellington Macedo.

A vulnerabilidade às DST em região com intensa prostituição e turismo sexual de Natal/RN*

The vulnerability to the STD in region with intense prostitution and sexual tourism of Natal/RN

Luciana Vilar de Sales Rocha¹, Veruska Cassandra Diniz², Jarine Torres de Araújo²,
Cinthia Kaline Rolim², André Franco Ribeiro Dantas³, Hênio Ferreira de Miranda³,
Francisco Ivo Cavalcante³ & Ana Conceição Ribeiro Dantas Saturnino^{1*}

RESUMO - Doenças sexualmente transmissíveis (DST) englobam uma série de doenças infecciosas causadas por microrganismos cuja via preferencial de transmissão é a sexual. Estima-se no mundo aproximadamente 333 milhões de novos casos de DST ao ano, representando a segunda maior causa de perda de vida saudável entre mulheres. Este trabalho teve como objetivo a investigação da prevalência dos principais agentes causadores de DST que podem ser detectados em esfregaços cervicais em duas comunidades com características de comportamento sexual e aspecto sócio-econômico distintos. Para isso, foi realizado um estudo retrospectivo em 4676 mulheres sexualmente ativas de 14 a 70 anos, sendo 1955 do atendimento realizado no bairro de Ponta Negra e 2721 resultantes do atendimento no bairro do Tirol, em Natal-RN, de janeiro de 2003 a dezembro de 2005. A prevalência de DST em Ponta Negra foi a mais elevada, apesar da procura para realização do exame preventivo ter sido menor. Fato que colabora com as características do bairro, que possui uma população mais carente, associada a altos índices de prostituição infanto-juvenil e turismo sexual. Em contrapartida, Tirol apresentou uma população com poder sócio-econômico mais elevado e um grau de esclarecimento maior, justificando, assim, menores índices de DST e maior procura por prevenção.

PALAVRAS-CHAVE - DST, Prevenção, Citologia Clínica, Prostituição.

SUMMARY - Sexually Transmitted Diseases (STD) encompass a series of infectious illnesses caused by micro-organisms whose preferential way of transmission is the sexual one. It is estimated in the world about 333 million new cases of STD a year, representing the second bigger cause of loss of healthful life among women. This work aimed at the investigation of the prevalence of the main causing agents of STD that can be detected in cervical smears in two communities with sexual behavior characteristics and distinct socio-economic aspects. For that, a retrospective study was accomplished in 4676 women sexually active from 14 to 70 years, being 1955 of the attendance carried out in the neighborhood of Ponta Negra and 2721 resultants of the attendance in the neighborhood of Tirol, in Natal-RN, from January of 2003 to December of 2005. The prevalence of STD in Ponta Negra, in spite of the search for accomplishment of the preventive test to have been lesser. Fact that collaborates with the characteristics of the neighborhood, that has a more lacking population, associated to high rates of child prostitution and sexual tourism. On the other hand, Tirol showed a population with higher socio-economic power and a degree of bigger clarification, thus justifying least STD rates and greater search by prevention.

KEYWORDS - STD, Prevention, Clinical Cytology, Prostitution.

INTRODUÇÃO

As doenças sexualmente transmissíveis (DST) são doenças graves que mobilizam e preocupam as mais diversas autarquias da Saúde Pública. Estima-se no mundo, a cada ano, cerca de 333 milhões de novos casos de DST, representando a segunda maior causa de perda de vida saudável entre as mulheres de 15 a 49 anos, depois da morbidade e mortalidade materna (ARAÚJO *et al.*, 2004).

No Brasil, as subnotificações de registros de casos confirmados e a falta de uma política nacional de prevenção e controle, impossibilitam qualquer avaliação epidemiológica. Segundo estimativas recentes feitas pelo Ministério da Saúde, ocorrem no Brasil cerca de 12 milhões de novos casos de DST ao ano. Como a notificação dos casos de DST não é compulsória e cerca de 70% das pessoas que apresentam alguma DST busca tratamento sem receitas médicas, em drogarias, o número de casos notificados fica muito abaixo da estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), que seriam cerca de 200 mil casos por ano (SOUZA *et al.*, 2004). Em consequência dos grandes conglomerados urbanos, do início mais precoce da atividade sexual, da maior divulgação dos métodos anticoncepcionais e do próprio apelo sexual que a sociedade impõe, observa-se hoje em dia a manutenção dos altos níveis de incidência das principais DST. Logo, as taxas de incidências oscilam segundo a população e a região analisada. A faixa etária mais acometida é, obviamente, entre 20 e 45 anos, época em que a atividade sexual e a troca de parceiros são mais freqüentes (ELEUTÉRIO-JÚNIOR *et al.*, 2001).

Consideradas como processos infecciosos causados por um grupo heterogêneo de agentes, agrupadas devido à significância epidemiológica da transmissão por meio do contato sexual, embora este não seja necessariamente o único meio de transmissão (REESE e BETTS, 1991), as DST podem causar disfunções sexuais, esterilidade, aborto, nascimento de bebês prematuros com problemas de saúde, deficiência física ou mental, alguns tipos de câncer e até a morte. Uma pessoa com DST tem mais chance de adquirir outras DST, inclusive a AIDS. O impacto das DST à saúde é grande, principalmente, na mulher infectada que pode transmitir a doença ao parceiro e ao feto, se estiver grávida, ou ao recém-nascido. Porém, ao ser diagnosticada precocemente, a maioria das DST pode ser tratada com eficácia, sem risco de complicações (BRABIN *et al.*, 2001).

As DST englobam todas aquelas doenças que podem ser adquiridas durante o ato sexual, isto é, no coito propriamente dito ou nos eventos que o cercam, seja a causa vírus, fungos, parasitos e/ou bactérias.

Entre as DST consideradas pela OMS como de freqüente transmissão sexual, destacam-se herpes genital, condiloma acuminado, tricomoníase, candidíase, infecções causadas por *Chlamydia trachomatis* e vaginose bacteriana como de fácil detecção pelo método de Papanicolaou (STINGHEN *et al.*, 2004). A sintomatologia das patologias ginecológicas, infecciosa e inflamatória, assemelha-se razoavelmente, independente de suas causas. A queixa mais comum é a alteração da secreção vaginal, que aumenta em quantidade e, por vezes, demonstra odor forte e proeminente. A presença de leucor-

Recebido em 17/11/2006

Aprovado em 18/05/2007

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRN, ²Farmacêutica Bioquímica, ³Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFRN. Apoio Financeiro: MEC-SESu, PROEXT-UFRN.

reia com o odor característico em conjunto a um prurido intenso constituem, na maioria dos casos, os principais sintomas associados aos processos inflamatórios das DST (ROCHA e CUNHA, 1998).

O exame periódico de Papanicolaou é reconhecido como um importante método na prevenção e diagnóstico precoce do câncer de colo uterino, bem como, no diagnóstico das inflamações cervicovaginais, sendo de fácil execução e baixo custo (LARA *et al.*, 1999).

A indicação diagnóstica de algumas DST pelo método de Papanicolaou se dá pela identificação morfológica direta, seja confirmando ou sugerindo a presença do agente, ou por alterações citopáticas provocadas por certos microrganismos, com grau aceitável de sensibilidade e de especificidade, algumas vezes similar, ou mesmo superior a outras metodologias rotineiras (MORAES FILHO e LONGATTO FILHO, 2000; STINGHEN *et al.*, 2004; SATURNINO *et al.*, 2005).

Neste contexto, a realização deste estudo se justificou, principalmente, pela real necessidade de uma proposta de abordagem desta problemática em questão, as DST. Portanto, esse trabalho teve como objetivo pesquisar a prevalência dos principais agentes causadores de DST detectados pela citopatologia cervicovaginal em duas comunidades com características de comportamento sexual e aspecto sócio-econômico e cultural distintos, dos bairros de Ponta Negra e Tirol da cidade do Natal/RN.

MATERIAL E MÉTODOS

A população estudada foi composta de mulheres sexualmente ativas, com idade variando de 14 a 70 anos, que procuraram espontaneamente atendimento médico ginecológico para consulta de rotina, seguido de encaminhamento para a realização do exame preventivo. Os sujeitos da pesquisa foram provenientes de Unidades de Saúde, localizadas nos bairros de Ponta Negra (Centro de Saúde de Ponta Negra) e Tirol (Centro de Saúde São João), da cidade do Natal-RN, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2005. A amostragem total da investigação foi de 4676 pacientes, sendo 1955 do atendimento realizado no bairro de Ponta Negra e 2721 resultantes do atendimento no bairro do Tirol. Foi realizado um estudo retrospectivo de caráter exploratório, com abordagem quantitativa dos laudos das citologias cervicovaginais emitidos pelos respectivos Centro de Saúde de Ponta Negra e Centro de Saúde São João. As amostras para o exame citopatológico foram obtidas por meio de coleta com espátula de Ayre e escova endocervical, para confecção do esfregaço por citologia convencional. O mesmo foi fixado imediatamente e corado pela técnica de Papanicolaou. Os laudos emitidos seguiram a nomenclatura do Sistema de Bethesda (SOLOMON e NAYAR, 2005).

Na análise estatística, estabeleceu-se a correlação entre os dados obtidos de prevalência de DST nos dois bairros, Ponta Negra e Tirol, fazendo uso de teste *t Student*, no software 'Prism' 4.0, considerando como nível de significância $p < 0,005$.

RESULTADOS

No Centro de Saúde de Ponta Negra, foram realizadas em 2003, 653 citologias, com 31,5% (206 casos) positivos para os principais agentes causadores de DST. Neste mesmo período, no Centro de Saúde São João, foram realizados 836 citologias, com 19,4% (162 casos) resultados positivos para os mesmos agentes. Em 2004 no Centro de Saúde de Ponta Negra, foram realizadas 596 citologias, com 43,3% (258 casos) resultados positivos para os mesmos agentes. Ainda,

em 2004, no Centro de Saúde São João, foram realizadas 988 citologias, com 29,2% (288 casos) resultados positivos para os mesmos agentes. Já em 2005, foram realizadas no Centro de Saúde de Ponta Negra, 706 citologias com 38,7% (273 casos) resultados positivos para os principais agentes causadores de DST. Neste mesmo período, no Centro de Saúde São João, foram realizadas 897 citologias, com 17% (153 casos) resultados positivos para os mesmos agentes (Figura 1).

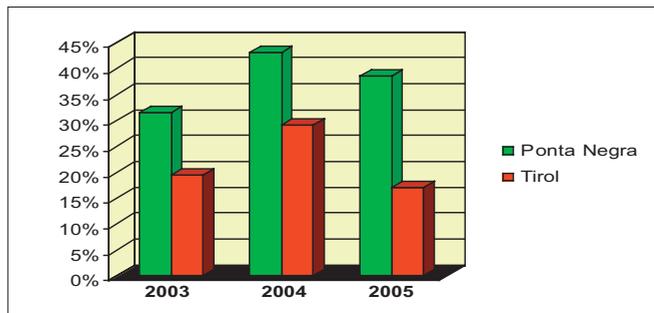


Figura 1 - Distribuição de pacientes com DST em exame citopatológico nos bairros de Ponta Negra e Tirol, Natal-RN. (FONTE: Centro de Saúde de Ponta Negra e Centro de Saúde São João – SMS – Natal-RN, 2003 a 2005).

Na Figura 2 e Figura 3, os resultados mostram uma prevalência bastante elevada de *Gardnerella vaginalis* nos três anos consecutivos nas duas comunidades. O número de casos de *Trichomonas vaginalis* em Ponta Negra oscilou nos três anos; já, no Centro de Saúde São João o número de casos positivos para esse parasito diminuiu no decorrer dos anos. A presença de *Candida sp.* oscilou nestes achados, tanto para o bairro de Ponta negra como para o de Tirol. Enquanto que a presença elevada de *Chlamydia trachomatis* aumentou no último ano no bairro de Ponta Negra; observou-se que os poucos casos registrados no bairro do Tirol tenderam a diminuir.

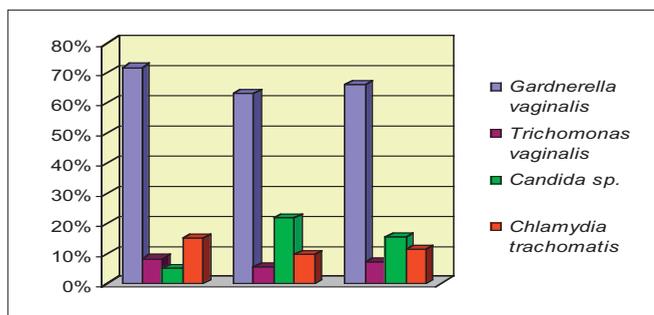


Figura 2 - Prevalência dos principais agentes causadores de DST em Ponta Negra. (FONTE: Centro de Saúde de Ponta Negra – SMS Natal-RN, 2003 a 2005).

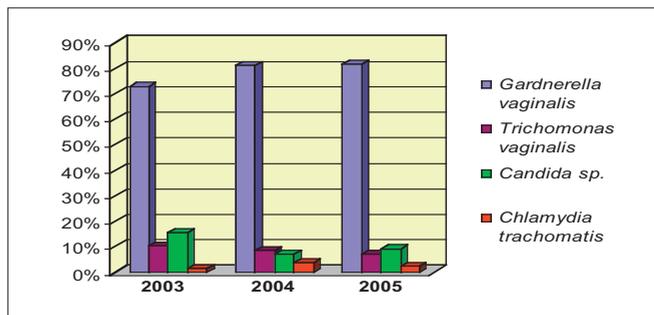


Figura 3 - Prevalência dos principais agentes causadores de DST no Tirol. (FONTE: Centro de Saúde São João – SMS Natal-RN, 2003 a 2005).

Os resultados observados na Tabela 1 mostram que das 737 citologias positivas para os principais agentes causadores de DST realizadas no Centro de Saúde Ponta Negra os achados foram de 66,7% (492 casos) para *G. vaginalis*, sendo distribuídos da seguinte forma: 71,8% (148 casos), 63,2% (163 casos) e 66,3% (181 casos) de citologias sugestivas para *G. vaginalis* nos anos de 2003, 2004 e 2005, respectivamente. Casos positivos para *T. vaginalis* foram de 6,8% (50 casos), ou seja, 8,2% (17 casos) em 2003, 5,4% (14 casos) em 2004 e 7% (19 casos) em 2005. Os achados para organismos fúngicos morfológicamente consistentes com *Candida sp.* foram de 14,7% (108 casos), sendo distribuídos da seguinte forma: 4,9% (10 casos) em 2003, 21,7% (56 casos) em 2004 e 15,4% (42 casos) em 2005. Os casos sugestivos para *C. trachomatis* foram de 11,8% (87 casos) distribuídos nos anos de 2003, 2004 e 2005 respectivamente: 15,1% (31 casos), 9,7% (25 casos) e 11,4% (31 casos).

TABELA I
Distribuição dos principais agentes causadores de DST em Ponta Negra, de 2003 a 2005

Principais Agentes causadores de DST em Ponta Negra	Número de casos positivos			Total de casos (%)
	2003	2004	2005	
<i>Gardnerella vaginalis</i>	148	163	181	66,7%
<i>Trichomonas vaginalis</i>	17	14	19	6,8%
<i>Candida sp</i>	10	56	42	14,7%
<i>Chlamydia trachomatis</i>	31	25	31	11,8%

Na Tabela 2 observa-se que, no Centro de Saúde São João, das 603 citologias positivas para os principais agentes causadores de DST, os achados foram de 78,9% (476 casos) para *G. vaginalis*, sendo distribuídos da seguinte forma: 72,8% (118 casos), 80,9% (233 casos) e 81,7% (125 casos) de citologias sugestivas para *G. vaginalis* nos anos de 2003, 2004 e 2005, respectivamente. Casos positivos para *T. vaginalis* foram de 8,6% (52 casos), ou seja, 10,5% (17 casos) em 2003, 8,4% (24 casos) em 2004 e 7,2% (11 casos) em 2005. Os achados para organismos fúngicos morfológicamente consistentes com *Candida sp.* foram de 9,8% (59 casos), sendo distribuídos da seguinte forma: 15,4% (25 casos) em 2003, 6,9% (20 casos) em 2004 e 9,2% (14 casos) em 2005. Os casos sugestivos para *C. trachomatis* foram de 2,7% (16 casos) distribuídos nos anos de 2003, 2004 e 2005 respectivamente: 1,3% (2 casos), 3,8% (11 casos) e 1,1% (3 casos).

TABELA II
Distribuição dos principais agentes causadores de DST em Tirol, de 2003 a 2005

Principais Agentes causadores de DST em Tirol	Número de casos positivos			Total de casos (%)
	2003	2004	2005	
<i>Gardnerella vaginalis</i>	118	233	125	78,9%
<i>Trichomonas vaginalis</i>	17	24	11	8,6%
<i>Candida sp</i>	25	20	14	9,8%
<i>Chlamydia trachomatis</i>	2	11	3	2,7%

Das mulheres que foram submetidas ao exame citológico, a faixa etária em que houve um predomínio *G. vaginalis* foi dos 21 aos 30 anos, nos dois Centros de Saúde estudados, como mostram a Tabela 3 e Tabela 4. Enquanto que a faixa etária em que houve um maior predomínio de casos sugestivos para *Chlamydia trachomatis* foi dos 31 aos 40 anos, no Centro de Saúde Ponta Negra e 41 aos 50 anos no Centro de Saúde São João, Natal/RN.

TABELA III
Distribuição dos casos positivos de DST segundo a faixa etária no bairro de Ponta Negra

Faixa etária (anos)	<i>Gardnerella vaginalis</i> (%)			<i>Trichomonas vaginalis</i> (%)			<i>Candida sp.</i> (%)			<i>Chlamydia trachomatis</i> (%)		
	2003	2004	2005	2003	2004	2005	2003	2004	2005	2003	2004	2005
Até 20	17,6	11,0	16,6	11,8	7,1	10,5	20,0	5,4	2,4	12,9	0,0	6,5
21-30	34,4	39,8	34,3	23,5	28,6	15,8	30,0	50,0	45,2	22,6	32,0	32,2
31-40	28,3	29,5	22,6	23,5	28,6	31,6	40,0	35,6	28,6	32,3	36,0	38,7
41-50	14,2	12,9	16,6	29,4	35,7	10,5	10,0	5,4	16,7	22,6	20,0	19,4
51-60	4,1	4,3	7,2	11,8	0,0	26,3	0,0	1,8	7,1	3,2	8,0	0,0
>60	1,4	2,5	2,7	0,0	0,0	5,3	0,0	1,8	0,0	6,4	4,0	3,2

TABELA IV
Distribuição dos casos positivos de DST segundo a faixa etária no bairro do Tirol

Faixa etária (anos)	<i>Gardnerella vaginalis</i> (%)			<i>Trichomonas vaginalis</i> (%)			<i>Candida sp.</i> (%)			<i>Chlamydia trachomatis</i> (%)		
	2003	2004	2005	2003	2004	2005	2003	2004	2005	2003	2004	2005
Até 20	6,8	9,9	8,0	11,8	4,2	27,3	4,0	0,0	7,2	0,0	9,0	0,0
21-30	36,4	27,9	36,0	35,3	45,8	27,3	24,0	35,0	21,4	0,0	18,2	0,0
31-40	26,3	31,8	22,4	17,6	16,7	45,4	32,0	40,0	35,7	50,0	18,2	0,0
41-50	21,2	21,0	24,0	29,4	33,3	0,0	16,0	20,0	35,7	50,0	27,3	66,6
51-60	5,9	5,6	7,2	5,9	0,0	0,0	20,0	5,0	0,0	0,0	27,3	33,4
>60	3,4	3,8	2,4	0,0	0,0	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

DISCUSSÃO

A prevalência de DST no bairro de Ponta Negra (37,7%) foi mais elevada do que no Tirol (22,2%), apesar da procura para a realização do exame preventivo ter sido menor em Ponta Negra (1955 mulheres) frente a procura no bairro do Tirol (2721 mulheres). Em um estudo realizado no Rio de Janeiro, TAQUETTE *et al.* (2004) mostram uma prevalência de 31,1% para DST em mulheres atendidas na UERJ. Na presente pesquisa, os dados apontam para uma positividade média de DST em Ponta Negra um pouco mais elevada. Estes resultados estão de acordo com as características gerais peculiares a cada bairro. Visto que, Ponta Negra é constituída de uma população flutuante jovem de turistas, paralelo a uma população mais carente residente em uma grande área de seu bairro (Vila de Ponta Negra), reforçando, assim, os achados compatíveis com seus índices elevados de DST e com a baixa procura por prevenção, associados ao comportamento social e características sócio-econômicas e culturais desta população em particular. Em contrapartida, o bairro do Tirol apresentou um índice de DST menor e uma procura maior por prevenção, estando de acordo com as características gerais do bairro, que apresenta visível poder sócio-econômico elevado, estando pertinente com o grau de esclarecimento desta comunidade, bem como, com a ausência de uma população flutuante de turistas jovens tão marcante como a presente em Ponta Negra.

Durante os três anos analisados, a *G. vaginalis* foi o agente mais comumente encontrado nos dois bairros, predomínio este também relatado por LARA *et al.* (1999). Porém, vale salientar, que o índice destes autores foi bem inferior (14,14%) aos encontrados na presente pesquisa, que teve uma média de 73% de casos consistentes com esta vaginose.

Pode ser observado que a *G. vaginalis* no bairro de Ponta Negra foi mais prevalente na faixa etária de 21 a 40 anos. Em comparação, no Tirol, esta também teve uma prevalência dos 21 a 40 anos, estendendo-se, porém, até os 50 anos. A precocidade do início da vida sexual, população constituída de indivíduos mais jovens, turistas, prostituição (inclusive infanto-juvenil), turismo sexual, baixa renda, nível de escolaridade e esclarecimento, entre outros, podem ser motivos para justificar este achado em Ponta Negra. Em contrapartida, no bairro do Tirol, estes dados mostram uma população constituída por indivíduos de nível econômico mais equilibrado, com mais idade e melhor escolaridade, corroborando com o predomínio dos agentes numa idade mais avançada. Este fato pode ser justificado pela melhor qualidade de vida e mulheres, em sua maioria, na perimenopausa ou pós-menopausa, situação fisiológica que contribui para este achado.

Alguns fatores têm contribuído para o aumento da incidência das DST: desinformação sobre o assunto devido à diminuição das campanhas educativas, automedicação ou medicação indicada por pessoas não-qualificadas, multiplicidade de parceiros, maior liberdade para a prática de atividade sexual em decorrência do uso de métodos anticoncepcionais,

dificuldade na investigação dos parceiros sexuais, menor temor do público por essas doenças pela facilidade do diagnóstico e tratamento, facilidade de deslocamento das populações (turismo nacional e internacional) e, por fim, o aparecimento de resistência microbiana aos antibióticos e quimioterápicos (GALVÃO *et al.*, 2003; FAÇANHA *et al.*, 2004). Inúmeros estudos mostram que jovens carentes ou residentes em comunidades de baixa renda estão sujeitos, com maior frequência, aos comportamentos ditos de 'risco' que influenciam a sua saúde. No caso particular de problemas de saúde relacionados com DST, adolescentes das chamadas 'minorias sociais' demonstram maior atividade sexual, idade mais precoce de início de relacionamento sexual, maior número de parceiros sexuais e uso menos freqüente de preservativos, o que mostra que uma das principais formas de combater as DST é a conscientização da população (GALVÃO *et al.*, 2003; FAÇANHA *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2004).

Compatíveis com dados mundiais, a trichomoníase foi mais freqüente em mulheres com maior faixa etária e mais favorecidas economicamente (MACIEL *et al.*, 2004), porém os dados revelam um concordância nos achados deste agente referente à prevalência dos dois bairros de uma maneira geral. Os achados quanto à presença de candidíase nestas duas comunidades foram compatíveis ao observado na média nacional. Entretanto, no bairro de Tirol, os dados são um pouco inferiores ao observado em Ponta Negra. Este fato pode ser devido ao sistema imunológico, ainda pouco estudado, desempenhar um papel na proteção contra a doença candidíase vulvovaginal. A tolerância vaginal ao fungo pode ser substituída por uma resposta hiperimune, resultando em intolerância aguda ou sensibilização aos antígenos da *Candida*. Desta forma, algumas regiões ou determinadas populações podem apresentar certa resistência imunológica e, assim, apresentarem relato de poucos casos ou casos assintomáticos (URBANETZ *et al.*, 2002; STINGHEN *et al.*, 2004; SATURNINO *et al.*, 2005).

Algumas DST, como a candidíase, não são doenças de notificação compulsória em nosso meio e em outros países; portanto, os números reais de prevalência e incidência não são bem conhecidos. Os dados existentes referem-se a estatísticas de determinados serviços ou de pesquisas como esta, dando uma idéia aproximada do número de casos de tais patologias. Por outro lado, podemos observar que os resultados em Ponta Negra colaboram ao representar um quadro sintomatológico comum de queixas nas consultas ginecológicas das mulheres sexualmente ativas (SATURNINO *et al.*, 2005). Pode ser demonstrado claramente uma alta prevalência de 11,8% casos sugestivos para *C. trachomatis* no bairro de Ponta Negra, frente a 2,7% no bairro de Tirol. Os dados de STINGHEN *et al.* (2004) de 1,4% e a média de prevalência de 2,6% a 5,6%, resultado da análise de vários estudos na literatura realizado por CARVALHO *et al.* (2004) contribuem para a importância do achado citológico desta pesquisa, visto que, as cervicites causadas por *C. trachomatis* apresentam importante impacto na saúde reprodutiva da mulher. Os dados com baixa prevalência deste microrganismo devem ser analisados com cautela, levando em consideração as políticas de saúde, a prática clínica, a sensibilidade do teste diagnóstico, o acesso da população aos serviços de saúde e as infecções assintomáticas (CARVALHO *et al.*, 2004). Outro dado interessante desta pesquisa foi a relação de uma maior prevalência deste microrganismo com uma maior faixa etária, apesar de a maioria das literaturas apontarem uma maior presença na população jovem sexualmente ativa (CARVALHO *et al.*, 2004; STINGHEN *et al.*, 2004). Várias combinações de fatores de risco das pacientes, sinais fi-

sicos e testes laboratoriais, quando analisados conjuntamente, mostram-se satisfatórios quanto a sua capacidade em detectar, em alguns estudos, as DST (MENEZES e FAÚNDES, 2004). Os resultados obtidos nesse trabalho enfatizam a necessidade de exames laboratoriais baratos, simples e rápidos para serem adotados rotineiramente em mulheres, sejam jovens ou não, ainda que assintomáticas, independente de fatores de risco identificáveis, no intuito de reduzir suas patologias e aumentar o diagnóstico correto e precoce de infecções, evitando assim, complicações no curso da doença e tratamento. A realização do exame de Papanicolaou é uma importante ferramenta no direcionamento de DST, ainda que não seja seu objetivo principal. Com a sua aplicação foi possível detectar uma prevalência elevada de DST em Ponta Negra, frente a Tirol, embora a procura pela prevenção tenha sido maior neste último. Isto mostra que as condições sócio-culturais e econômica são determinantes no perfil e conduta sexual da população, demonstrando que as torna mais vulnerável ou não diante às DST.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Saúde de Ponta Negra e Centro de Saúde São João por todo apoio e disposição dispensado a este diagnóstico, como também, a Secretaria Municipal de Saúde da cidade do Natal/RN.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M.A.L.; BUCHER, J.S.N.F.; BELLO, P.Y. Eficácia do aconselhamento para doenças sexualmente transmissíveis em unidades de referência da cidade de Fortaleza, CE, Brasil. DST - J bras Doenças Sex Transm 16(1): 31-7, 2004.
- BRABIN, L.; CHANDRA-MOULI, L.; FERGUSO, G.; FERGUSON, J.; NDWA, F. Tailoring clinical management practices to meet the special needs of adolescents: sexually transmitted infections. Int J Obst Gynecol 75: 123-36, 2001.
- CARVALHO, N.S.; ANGELI, R.; KRAJDEN, M. Prevalência dos agentes de cervicite: análise da literatura. DST - J bras Doenças sex transm 16(4): 56-60, 2004.
- ELEUTÉRIO-JÚNIOR, J.; BARBOSA, R.C.C.; COSTA, N.N.; CÉSAR, A.B.F.; SAMPAIO, S.B. Esfregaços endocervicais por escova: avaliação citológica e correlações clínico-colposcópicas. RBAC 33(4): 175-8, 2001.
- FAÇANHA, M.C.; MENEZES, B.L.F.; FONTENELE, A.D.B.; MELO, M.A.; PINHEIRO, A.S.; CARVALHO, C.S.; PORTO, I.A.; PEREIRA, L.O.C. Conhecimento sobre reprodução e sexo seguro de adolescentes de uma escola de ensino médio e fundamental de Fortaleza - Ceará. DST - J bras Doenças sex transm 16(2): 5-9, 2004.
- GALVÃO, M.T.G.; ALENCAR, R.A.; FERREIRA, M.L.S.M.; ANTUNES, R.C.F.S. Sexualidade e conhecimento das doenças sexualmente transmissíveis e AIDS entre adultos em um município do interior do Nordeste brasileiro. DST - J Bras Doenças Sex Transm 15(3): 37-40, 2003.
- LARA, B.M.R.; FERNANDES, P.A.; MIRANDA, D. Diagnósticos citológicos cervicovaginais em laboratório de médio porte de Belo Horizonte-MG. RBAC 31(1): 37-40, 1999.
- MACIEL, G.P.; TASCA, T.; DE CARLI, G.A. Aspectos clínicos, patológicos e diagnóstico de Trichomonas vaginalis. J Bras Patol Méd Lab 40(3): 152-60, 2004.
- MENEZES M.L.B.; FAÚNDES A.E. Validação do fluxograma de corrimento vaginal em gestantes. DST-J Bras Doenças Sex Transm 16: 38-44, 2004.
- MORAES FILHO, A.; LONGATTO FILHO, A. Colo uterino e vagina. Processos inflamatórios. Aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
- REESE, R.; BETTS, R.F.A. A practical approach to infections diseases. Boston: Little, Brown and Company, 1991.
- ROCHA, F.J.S.; CUNHA, G.M.A. Estudo retrospectivo da incidência de vulvovaginites, cervicites e neoplasias intra-epiteliais cervicais em mulheres atendidas pelo serviço de prevenção ao câncer ginecológico e de mama no município de Aracati-CE. RBAC 30(2): 45-8, 1998.
- SATURNINO, A.C.R.D.; SISENANDO, H.A.A.C.; PEREIRA, A.R.; VALE, A.P.M.; PIRES, L.M.; ARAÚJO, J.T.; RAMOS, E.S.N. Vulvovaginites: estudo das variações de pH vaginal e microflora associada. Acta Cirurg Bras 20(1): 266-9, 2005.
- SOLOMON, D.; NAYAR, R. Sistema Bethesda para citopatologia cervicovaginal. Definições, critérios e notas explicativas. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.
- SOUZA, M.M.; BOREGES, I.K.; MEDEIROS, M.; TELES, S.A.; MUNARI, D.B. A abordagem de adolescentes em grupos: o contexto da educação em saúde e prevenção de DST. DST - J bras Doenças Sex Transm 16(2): 18-22, 2004.
- STINGHEN, A.E.M.; NASCIMENTO, A.J.; LEONART, M.S.S. Método de papanicolaou em material cervicovaginal para a triagem de infecção por *Candida* sp., *Trichomonas vaginalis* e *Chlamydia trachomatis*. RBAC 36(2): 111-5, 2004.
- TAQUETTE, S.R.; VILHENA, M.M.; PAULA, M.C. Doenças sexualmente transmissíveis na adolescência: estudo de fatores de risco. Rev Soc Bras Med Trop 37(3): 210-4, 2004.
- URBANETZ, A.A.; BERTASI, S.; ZAMBONA, S.; PETRY, A.C.M. Quadro Clínico e métodos de diagnósticos das vulvovaginites mais freqüentes. Femina 30(2): 117-23, 2002.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:
Prof.ª Dr.ª Aná Conceição Ribeiro Dantas Saturnino
Av. Bernardo Vieira, 4114, ap. 404, Morro Branco
CEP 59051-005
sassuana@ufrnet.br

Freqüência de cepas produtoras de enzima beta lactamase de espectro expandido (ESBL) e perfil de susceptibilidade de *Klebsiella pneumoniae* em hemoculturas no berçário de um hospital de Fortaleza*

Producing frequency strain of extended spectrum beta lactamase enzyme (ESBL) and profile of susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* in bloods cultures in the nursery of a hospital of Fortaleza

Everardo Albuquerque Menezes¹, Angélica Menon de Alencar¹, Francisco Afrânio Cunha¹, Maria Rozellê Ferreira Ângelo², Maria Núbia Cavalcante Salviano² & Inácio Regis Nascimento Oliveira²

RESUMO - As infecções no período neonatal são mais freqüentes e habitualmente mais severas do que em qualquer outra época da vida. Ainda hoje, os processos infecciosos são os principais responsáveis pela elevada morbidade e mortalidade nesse período. O objetivo deste estudo foi verificar a freqüência e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos nas hemoculturas positivas para *Klebsiella pneumoniae* isoladas de recém nascidos do berçário do Hospital Geral de Fortaleza nos meses de julho a dezembro de 2003. Foi realizado um trabalho retrospectivo neste período, as hemoculturas foram realizadas no aparelho de automação Bactec, as hemoculturas positivas foram semeadas em ágar sangue e ágar MacConkey, as amostras positivas foram identificadas também no aparelho de automação Microscan Walkway. Neste período 7,11% das hemoculturas realizadas foram positivas para *Klebsiella pneumoniae* e destas 81,25% foram ESBL (Beta Lactamase de Amplo Espectro) positivos. As cepas produtoras destas betalactamases são responsáveis por infecções hospitalares e são, também, uma importante fonte de transferência de resistência aos antibióticos para outros microrganismos. Em relação ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pode-se observar que os mais susceptíveis foram cefoxitina, imipenem e ofloxacina e os mais resistentes foram a ceftazolidina, ceftriaxona, cefalotina, ampicilina, aztreonam, piperacilina e a tobramicina. Vários estudos mostraram que a implementação de uma restrição rigorosa ao uso de cefalosporinas de amplo espectro de ação, junto com as medidas gerais de controle das infecções hospitalares, podem diminuir a prevalência destas cepas.

PALAVRAS-CHAVE - Betalactamases. Hemoculturas. *Klebsiella pneumoniae*.

SUMMARY - The infections in the neonatal period they are more frequent and habitually more severe of the one than in any another time of the life. Still today, the infectious processes are main responsible for the raised morbidity and mortality in this period. The objective of this study was to verify the frequency and the profile of susceptibility to antimicrobials in the positive bloods cultures it stops *Klebsiella pneumoniae* isolated of just been born of the nursery of the General Hospital of Fortaleza in the months of July the December of 2003. A retrospective work in this period was carried through, the bloods cultures had been carried through in the device of Bactec automation, positive bloods cultures had been sown in agar blood and MacConkey agar, positive samples had been identified also in the automation device Microscan Walkway. In this period 7.11% of the carried through bloods cultures they had been positive stop *Klebsiella pneumoniae* e of these 81.25% had been ESBL (Extended Spectrum Beta Lactamase) positive. Strain producing of these ESBL is responsible for hospital infections and is, also, one important source of transference of resistance to antibiotics for others microorganisms. In relation to the profile of susceptibility to antimicrobials it can to observe that susceptible they had been cefoxitin, they imipenem and ofloxacin and more resistant they had been the ceftazolin, ceftriaxone, cefalotin, ampicillin, aztreonam, piperacillin and the tobramycin. Some studies had shown that implementation of a rigorous restriction to the use of cephalosporin of ample specter of action, together with the general measures of control of the infections hospital, they can diminish the prevalence of these strain.

KEYWORDS - Betalactamases. Blood cultures. *Klebsiella pneumoniae*.

INTRODUÇÃO

As infecções no período neonatal são mais freqüentes e habitualmente mais severas do que em qualquer outra época da vida. Os processos infecciosos são, ainda hoje, os principais responsáveis pela elevada morbidade e mortalidade nesse período¹.

O recém-nascido não apresenta microbiota endógena sendo susceptível a qualquer organismo a que seja exposto. Assim sendo, essa microbiota adquirida pela pele e mucosas reflete a microbiota do trato genital materno e do berçário, oriunda de outros recém-nascidos, pessoal médico e paramédicos, objetos inanimados contaminados, entre outros. A imaturidade do sistema imunológico do recém-nascido, principalmente dos prematuros, os vários procedimentos evasivos, a longa permanência hospitalar, além de outros fatores, facilitam as infecções. Muitos recém-nascidos, principalmente nascidos a termo, podem apresentar sinais clínicos de infecção somente após a alta hospitalar, ficando difícil a vigilância epidemiológica posterior².

O recém-nascido sadio estabelece sua microbiota normal poucos dias após o nascimento. Bactérias Gram positivas predominam na faringe, estafilococos coagulase negativo no coto umbilical. A colonização do trato gastrointestinal é diferente conforme o tipo de dieta: com leite materno, a prevalência de bifidobactérias e *Escherichia coli*; o uso de fórmulas lácteas favorece a colonização por enterobactérias e bacteróides³.

Epidemias por *Klebsiella pneumoniae* ocorridas em berçários foram comprovadamente associadas à transmissão pelas mãos da equipe³.

A *Klebsiella* é de origem hospitalar, com transmissão de recém nascido a recém-nascido, via mão contaminada, permanecendo na pele, sendo o trato gastrointestinal o maior reservatório no recém-nascido¹.

Sendo detectado uma infecção por *Klebsiella pneumoniae* no recém-nascido é feito o ESBL para verificar se a bactéria é produtora de Beta Lactamase, pois sua produção pela bactéria tem sido descrita como um importante mecanismo

Recebido em 19/04/2006

Aprovado em 18/05/2007

*Trabalho realizado no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral de Fortaleza.

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará;

²Hospital Geral de Fortaleza

de resistência a beta-lactâmicos em espécies da Família *Enterobacteriaceae*, e seu achado constitui um dado clínico relevante. Os beta-lactâmicos constituem a principal classe de antimicrobianos utilizada na prática clínica e a resistência a esta classe em meio aos bastonetes Gram-negativos é um dos principais mecanismos de resistência⁴.

Dentre os grupos de betalactamases reconhecidas, encontramos as cefalosporinas cromossomiais (AmpC), as enzimas que hidrolisam as carbapenemas e as betalactamases de espectro ampliado (ESBLs). O aparecimento das ESBLs restringe as opções terapêuticas utilizadas no tratamento das infecções neonatais causadas por *Klebsiella pneumoniae* (ou qualquer microrganismo produtor de betalactamases). A detecção de cepas produtoras de ESBL constitui um desafio ao laboratório de microbiologia clínica, com impacto direto no controle deste mecanismo de resistência e no uso indevido de beta-lactâmicos⁴.

A produção de betalactamases não é facilmente reconhecida nos testes de sensibilidade a antimicrobianos realizados na rotina de um laboratório clínico, e são necessários testes confirmatórios que detectem este fenótipo de resistência. Frequentemente a identificação de cepas ESBL-produtoras é baseado em características fenotípicas como o aumento da concentração inibitória mínima (CIM) para cefalosporinas de terceira geração e/ou aztreonam. Embora as normas preconizadas pelo Clinical and Laboratory Standard Institut (CLSI) refiram-se às espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*, a ocorrência de cepas produtoras de ESBL entre outras espécies de enterobactérias tem despertado a atenção dos microbiologistas. A observação do aumento de isolados produtores de ESBL dentre outras espécies de enterobactérias que não aquelas padronizadas pelo CLSI, constitui um fator determinante que indica a necessidade de padronização de métodos para a detecção deste mecanismo de resistência. Sendo este mecanismo de resistência mediado por plasmídios, a produção de ESBL pode ser facilmente transmitida de microrganismo a microrganismo dentre as várias espécies de enterobactérias^{5,6}.

Por se considerada a resistência das cepas de *K. pneumoniae* um problema de saúde pública, resolveu-se fazer um estudo da frequência, de cepas produtoras de ESBL e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos no berçário de Hospital Geral de Fortaleza.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento e identificação de *Klebsiella*

Foram analisadas 225 amostras de hemocultura de recém-nascidos do Hospital Geral de Fortaleza, no período de julho de 2003 a dezembro de 2003 no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral.

O sangue foi coletado e colocado diretamente nas garrafas (BACTEC) devendo ser mantidos a temperatura ambiente, até serem incubadas no BACTEC 9240⁷, sistema automatizado de detecção fluorescente e não evasivo para o monitoramento contínuo e simultâneo de amostras de sangue, para detecção de bactérias e fungos.

O princípio da tecnologia do sistema BACTEC⁷ é baseado na detecção da produção de CO₂ através de luz fluorescente (monitorando a concentração de CO₂ produzido pelo metabolismo microbiano). O sinal fluorescente é então avaliado por um microprocessador e a positividade é indicada quando presente.

A identificação e a sensibilidade a antibióticos foram feitas pelo aparelho de automação MicroScan^{®7}, foram utilizados painéis NUC2 e NC20 Convencionais Liofilizados MicroScan[®] Liofilizados MIC/Combo, destinados a determinação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos.

Após o preparo dos painéis, o sistema de inoculação Prompt* foi usado para inocular testes antimicrobianos de susceptibilidade por microdiluição (MIC).

O procedimento de microdiluição para a determinação da sensibilidade de antibióticos fornece ao microbiologista um método seguro para a obtenção de resultados quantitativos para testes de sensibilidade. Este procedimento é usado para determinação da concentração inibitória mínima (MIC) dos antimicrobianos. A precisão e a reprodutibilidade no procedimento de determinação de MIC depende do uso de determinados métodos e materiais.

Uma das mais importantes exigências no procedimento de determinação do MIC é o controle da população bacteriana inoculada dentro de limites definidos.

O sistema de inoculação Prompt* permite ao microbiologista que utilize um método seguro para determinar o inóculo que elimina a necessidade de incubação e ajustamento da turbidez. Para o uso do sistema Prompt* deve-se fazer a preparação da suspensão bacteriana, a adição da suspensão para bandeja teste e a transferência da suspensão bacteriana da bandeja teste para o painel MicroScan[®] convencional liofilizado Pos Combo. Colocando em seguida o painel no aparelho automatizado MicroScan[®] WalkWay⁷.

Os antimicrobianos utilizados no painel MicroScan[®] para *Klebsiella* foram amicacina, aztreonam, cefepime, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxone, cefuroxima, ciprofloxacina, imipenem, meropenem, gentamicin, levofloxacina, norfloxacina, ofloxacina, piperacilina, piperacilina/tazobactam, ticarcilina/ácido clavulônico e tobramicina.

Detecção de cepas produtoras de betalactamase

O método utilizado foi o de Dupla Difusão em Disco, também denominado teste de aproximação em disco (CLSI, 1999)⁹. O teste consiste na colocação de discos de cefalosporinas de amplo espectro, tais como cefuroxima, aztreonam, cefepime, ceftazidima/ácido clavulânico, cefotaxima e cefotaxima/ac. clavulânico, os dois últimos foram escolhidos para serem utilizados no teste, colocados distantes 30mm (centro a centro) de um disco que contenha um inibidor de betalactamase de preferência o ácido clavulânico. A formação de ESBL é indicada pela deformação (aumento) nos halos de inibição ao redor dos discos dos b-lactâmicos⁸.

RESULTADOS

Frequência de *Klebsiella pneumoniae* isoladas e as cepas produtoras de betalactamase

No período de julho de 2003 a dezembro de 2003 foram realizadas 225 hemoculturas de recém-nascidos no berçário do Hospital Geral de Fortaleza, destas 22 foram positivas para algum tipo de microrganismo e 16 foram positivas para *Klebsiella pneumoniae* (tabela 1 e figura 1). O isolamento, a identificação e o teste de susceptibilidade foram feitos pelo sistema de automação MicroScan[®]

O teste de Dupla-Difusão em Disco foi utilizado para detecção das cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamase (CSLI, 1999)⁹.

TABELA I
Prevalência de microrganismos detectados nas hemoculturas de neonatos no Hospital Geral de Fortaleza

Microorganismo	Prevalência %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	42,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15,8
Leveduras	18,4
<i>Staphylococcus sp</i>	10,5
<i>Serratia mascences</i>	2,6
<i>Streptococcus sp</i>	2,6
Outros	7,9

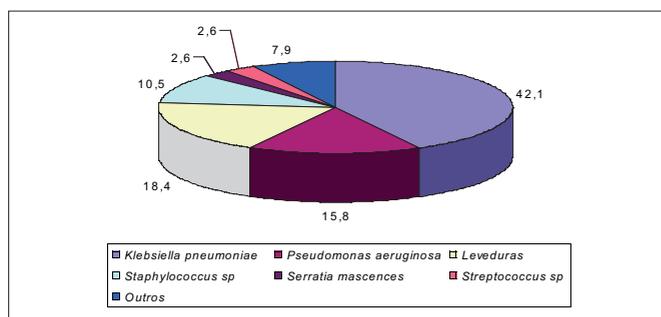


Figura 1: Prevalência de microrganismos detectados em Hemoculturas de neonatos no HGF.

A Tabela 2 e figura 2 mostram o percentual de *Klebsiella pneumoniae* sobre o total de hemoculturas realizadas em neonatos no HGF, pode-se observar que foram positivas 7,11% das cepas.

TABELA II
Percentual de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL em hemoculturas realizadas em neonatos no HGF.

Hemocultura (+)	Hemocultura (-)	<i>K.pneumoniae</i>	KP-ESBL(+)	KP-ESBL(-)
9,78%	83,11%	7,11%	81,25%	8,75%

KP- ESBL (+) - cepa de *K.pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro expandido.
KP- ESBL (-) - cepa de *K.pneumoniae* não produtora de betalactamase de espectro expandido.

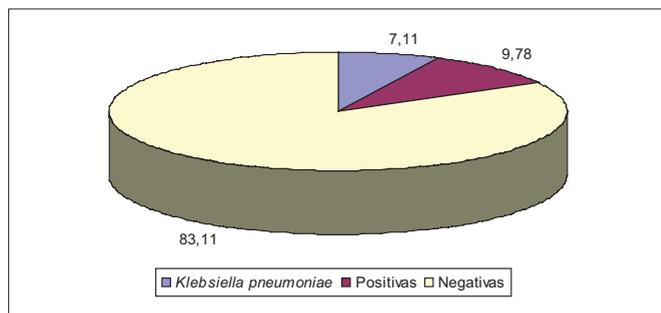


Figura 2: Percentual de *Klebsiella pneumoniae* sobre o total de hemoculturas positivas de neonatos do HGF

A Tabela 2 e a figura 3 mostra percentual de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL isoladas de hemoculturas de neonatos do HGF, pode-se observar 81,25% produziram ESBL.

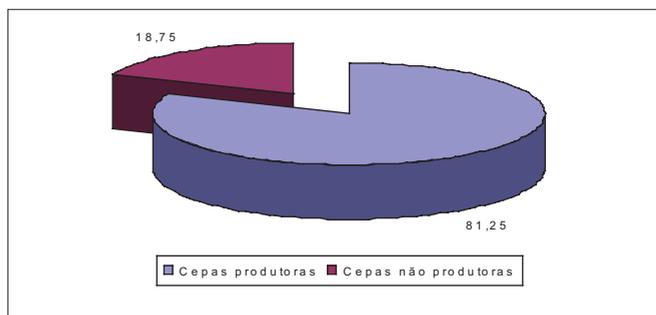


Figura 3: Percentual de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL isoladas de hemoculturas de neonatos no HGF.

Perfil de susceptibilidade e resistência de *Klebsiella pneumoniae* aos antimicrobianos usados no Berçário do Hospital Geral de Fortaleza

A Tabela 3 e a figura 4 mostram o perfil de susceptibilidade de cepas de *Klebsiella pneumoniae* isolados de hemoculturas de neonatos no HGF, pode-se observar que os mais antibióticos de maior atividade foram: cefoxitina, imipenem e ofloxacina e os de menor atividade foram: cefazolina, ceftriaxona, cefalotina, ampicilina, aztreonam, piperacilina e a tobramicina.

TABELA III
Perfil de susceptibilidade e resistência de *Klebsiella pneumoniae* aos antimicrobianos isolados de hemocultura de neonatos no HGF.

Classe/antibiótico	%Resistência
Cefalosporinas	
Cefazolina	100
Cefuroxima	80
Cefoxitina	00
Ceftriaxona	100
Cefepime	42
Cefotaxima	92
Cefpodoxima	90
Cefalotina	100
Outros Beta-lactâmicos	
Ampicilina	100
Amp/Sulbactam	83
Aztreonam	100
Pip/Tazo	30
Piperacilina	100
Imipenem	00
Aminoglicosídeos	
Gentamicina	67
Amicacina	83
Tobramicina	100
Fluoroquinolonas	
Ciprofloxacina	00
Ofloxacina	00
Outros	
Sulfa/trimet	50

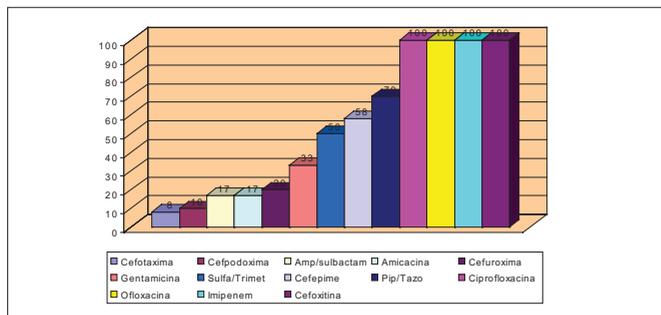


Figura 4: Perfil de susceptibilidade de cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de hemoculturas de neonatos no HGF.

DISCUSSÃO

Na última década observou-se um aumento significativo no isolamento de *Klebsiella pneumoniae* em amostras clínicas, e a elevada importância destes microrganismos é devido principalmente de sua resistência aos antimicrobianos.

Esta bactéria normalmente apresenta um baixo grau de virulência, ocorrendo principalmente em pacientes debilitados ou imunocomprometidos. É considerado um patógeno oportunista e, freqüentemente, responsável por infecções hospitalares, estando entre os agentes etiológicos de septicemia e infecções de ferida operatória¹⁰.

As infecções hospitalares são relativamente incomuns em neonatos normais, a taxa varia de 0,5 a 1,7%. Por outro lado, as taxas de infecções hospitalares entre recém-nascidos com baixo peso ao nascimento, são mais altas e variam de 20 a 33%; a incidência aumenta com a duração da hospitalização e idade gestacional menores¹¹.

Na figura 1, podemos observar a predominância de infecções causadas por *K. pneumoniae* sobre outros tipos de microrganismos. A disseminação de bactérias Gram-negativas com resistência adquirida a vários betalactâmicos de amplo espectro está se tornando um problema clínico mundial^{12,13}.

O estudo foi realizado no berçário do Hospital Geral de Fortaleza no período de julho a dezembro de 2003, neste período, foram realizadas 225 hemoculturas, sendo 16 positivas para *K. pneumoniae*, um percentual de 7,11% (figura 2); e destas, 13 cepas foram ESBL positivas, um percentual de 81,25% (figura 3). Este é um dado relevante, quando se sabe que a produção de betalactamase aumenta a resistência aos antimicrobianos. Os outros tipos de microrganismos somaram 22 hemoculturas positivas, um percentual de 9,77%. Segundo a literatura as infecções neonatais que se desenvolvem dentro do berçário são geralmente consideradas hospitalares, a exceção inclui infecções adquiridas do trato genital da mãe¹².

Menezes e Silva & Salvino, 2000¹⁴, isolaram em Vitória 53 enterobactérias produtoras de ESBL (14,5%), distribuindo-se da seguinte forma: *K. pneumoniae* 33 (62,2%), *E. coli* 9 (17%), *E. cloacae* 5 (9,4%), *K. oxytoca* 4 (7,5%), *S. marcescens* 2 (3,8%). Estas bactérias foram isoladas principalmente a partir de hemoculturas (41%). Os setores onde houve maior prevalência de enterobactérias produtoras de ESBL foram às unidades de terapia intensiva adulta e neonatal. No nosso trabalho verificamos 16 cepas de *K. pneumoniae* sendo também a primeira em relação as enterobactérias. Observamos que a maioria das cepas de *K. pneumoniae* produziram ESBL (81,25%) enquanto que Menezes e Silva & Salvino mostraram que 62,2% produziram ESBL.

É grande o número e variedade de novas betalactamases que tem surgido, como as de espectro ampliado. Estas enzimas se caracterizam pela capacidade em degradar praticamente todos os antibióticos betalactâmicos. Com introdução de novos betalactâmicos observaram-se mudanças em betalactamases com o aumento na prevalência de enzimas mais velhas, o aparecimento e a alteração no nível da expressão de enzimas novas¹⁵.

Segundo Blatt, 2000¹⁵, a prevalência de cepas produtoras de ESBL em alguns hospitais brasileiros, é em torno de 39%, semelhante aos descritos por outras pesquisas internacionais. No HGF está bem acima do que apresenta em alguns hospitais brasileiros, está com 81,25%.

O padrão de susceptibilidade e resistência das cepas de *Klebsiella* pode ser observado na figura 4. Das cefalosporinas utilizadas no teste de sensibilidade de antibióticos (TSA) a *Klebsiella* foi 100% sensível somente a cefoxitina, ao cefepime a sensibilidade foi de 58%, e sensibilidades num percentual menores que 20% foram detectadas com cefuroxima 20%, cefpodoxima 10% e cefotaxima 8%. Quanto à cefazolina, ceftriaxona e cefalotina a bactéria se mostrou 100% resistente. Estas resistências parecem ocorrer por uma redução do influxo dos antibióticos, impedidos de penetrar nas bactérias¹⁶. Mas o uso abusivo das cefalosporinas de terceira geração parece ser a principal causa deste mecanismo de resistência¹⁶.

As cepas de *Klebsiella* foram 100% sensíveis ao imipenem; 70% sensível a piperacilina/tazobactam; 17% sensível a ampicilina/sulbactam e nenhuma sensibilidade a ampicilina, aztreonam e piperacilina (figura 4). A estratégia de combate à resistência bacteriana, pela inibição das enzimas hidrolizadoras produzidas pelas bactérias, notadamente betalactamases, deu lugar à obtenção do ácido clavulânico, extraído de culturas do *Streptomyces clavuligerus*, seguido da síntese do sulbactam, uma sulfina do ácido penicilâmico e recentemente do tazobactam. Mesmo que isoladamente essas substâncias não tenham efeito antimicrobiano, associadas a antibióticos betalactâmicos, como ampicilina e piperacilina, se ligam as betalactamases inativadoras daquelas drogas, reduzindo de forma significativa o MIC (concentração inibitória mínima), para as bactérias sensíveis¹⁶. Isso ajuda a entender o porquê da piperacilina e ampicilina, não associadas ao tazobactam e sulbactam respectivamente, não apresentarem efeito sobre as cepas de *Klebsiella* ESBL positivas. Essa associação faz com que estes dois betalactâmicos fiquem livres da ação de enzimas hidrolizáveis, podendo exercer todo seu efeito inibitório sobre a parede celular, causando a destruição de agentes Gram-negativos e positivos¹⁶.

Dos aminoglicosídeos utilizados no teste, a tobramicina não apresentou nenhuma sensibilidade, a gentamicina foi 33% sensível e a amicacina apenas 17% (figura 4). Exerce um efeito sinérgico com os antibióticos betalactâmicos¹⁶. Teoricamente, são sobre os Gram-negativos, como a *Klebsiella*, que os aminoglicosídeos de amplo espectro, exercem a sua máxima atividade bactericida, atuando em baixas concentrações¹⁶. Mas o que se pode verificar é que sua eficácia já está reduzida, principalmente se a cepa for ESBL positiva.

As fluoroquinolonas utilizadas no TSA, ciprofloxacina e ofloxacina, obtiveram excelentes resultados, as cepas de *Klebsiella* apresentaram 100% de sensibilidade. A pre-

REFERÊNCIAS

sença do flúor e do anel piperazínico na estrutura básica veio aumentar de forma extraordinária a atividade antibacteriana intrínseca destes quimioterápicos, rotulados como quinolonas de 2ª geração, que incluem a norfloxacin, ciprofloxacina, pefloxacina, ofloxacina, reduzindo a resistência mutacional entre vários patógenos¹⁶. Em virtude do amplo espectro, as quinolonas de segunda geração, atuando principalmente contra Gram-negativos, tornando possível o tratamento por via oral de patógenos que antes requiriam hospitalização¹⁶.

Em relação à literatura internacional, observamos que no Japão, estudo realizado por Takahashi *et al.*, 1999¹⁷, os antimicrobianos imipenem e ceftazidima estão ficando incapazes de combater bactérias resistentes, está ocorrendo um crescente número de enzimas que hidrolizam cefalosporinas.

O surgimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos é inevitável, pela conservação e perpetuação das espécies, mas o controle na utilização dos mesmos pode limitar o aparecimento de cepas multirresistentes. O combate a estes microrganismos em hospitais pode ser realizado através do conhecimento da microbiota local e a valorização das comissões de controle de infecção hospitalar¹⁶.

A resistência das diversas espécies bacterianas aos antimicrobianos é extremamente variável entre países, região e a origem hospitalar ou comunitária das estirpes¹⁸.

O trabalho do laboratório de microbiologia é imprescindível na detecção das enterobactérias produtoras de ESBL e de possíveis surtos nosocomiais. Portanto, o microbiologista deve se manter sempre atualizado e preparado para realizar testes com acurácia cada vez maior e que estes reflitam com fidelidade os resultados encontrados. A detecção precoce destas bactérias multirresistentes é de suma importância para se instaurar o tratamento adequado e as medidas de isolamento dos pacientes, necessários para se evitar a disseminação destes patógenos.

CONCLUSÃO

• Das 225 hemoculturas realizadas no berçário do Hospital Geral de Fortaleza 38 foram positivas, um percentual de 16,88%.

• Das 38 amostras positivas, 57,90% foram positivas para algum tipo de microrganismo e 42,10% foram positivas para *Klebsiella pneumoniae*, mostrando a predominância de *Klebsiella* nas hemoculturas realizadas em neonatos.

• Do total de hemoculturas positivas para *Klebsiella pneumoniae*, 81,25% foram cepas produtoras de betalactamase.

• Os antimicrobianos que a bactéria apresentou maior sensibilidade foram ofloxacina, ciprofloxacina, imipenem e ceftazidima, todos com uma sensibilidade de 100%.

• Os antimicrobianos que apresentaram uma sensibilidade intermediária foram pip/tazo com 70% seguida do cefepime com 58%, sulfa/trimet com 50% e gentamicina com 33%.

• Antimicrobianos com menores índices de sensibilidade foram cefuroxima com 20%, amicacina 17%, amp/sulbactam 17% cefpodoxima 10% e cefotaxima 8%.

• Alguns antibióticos não apresentaram nenhuma atividade contra cepas de *Klebsiella*, foram: cefazolina, cefalotina, ceftriaxona, ampicilina, aztreonam, piperacilina e tobramicina.

1. FERNANDES, AT; FERNANDES, MOV; FILHO, NM. Infecção Hospitalar e suas interfaces na área de Saúde; Ed. ATHENEU São Paulo, 2000.
2. ZANON, U, NEVES JEDS. Infecções Hospitalares - diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro, Ed. MEDSI, p. 589-631, 1987.
3. COUTO. RENATO C., PEDROSA, TÂNIA MG, NOGUEIRA, JOSÉ M.. Infecção Hospitalar: epidemiologia, controle, gestão para qualidade. 2ª ed., MEDSI, p. 1-5/Pp.453-463, 1999.
4. DEL PELOSO P. F.; LEITE .C C. F.; SILVA, H. P.; FILHO H. M. T. - Importância da Utilização de Metodologias para a Detecção de ESBL em Espécies de Enterobactérias. NewsLab, 56:118-128, 2003.
5. SORIANO , P. R. Vade-mécum, 8ª edição, São Paulo, 2003.
6. JACOBY & HAN, P.R. Vade-mécum, 6ª. Edição, São Paulo, 1998.
7. KONEMAM, E. W.; ALLEN, S.; D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER P. C.; WINN JR.; W. C. - Diagnóstico Microbiológico. Editora MEDSI, 5ª ed. São Paulo., p. 214-217 / p. 807-810, 2001.
8. SANTOS FILHO, L.; SANTOS, I.B.; LIMA DE ASSIS, A.M.; XAVIER, D.E. Determinação da produção de metalo beta lactamase em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 38:79-84, 2002.
9. COMMITTEE AND LABORATORY STANDARD INSTITUT. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. National Committee for clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 1999.
10. SANTOS FILHO, L.- Diagnóstico Microbiológico, 3ª edição, JOÃO PESSOA, 2003.
11. NELSON, WANDO E. Tratado de Pediatria. Ed. Guanabara Koogan, Vol.1, 15ª edição, Rio de Janeiro, 1997
12. ARAKAWA, Y.; SHIBATA, N.; SHIBAYAMA, K.; KUROKAWA, H.; TETSUYA, Y.; FUJIWARA, H.; GOTO, M. - Convenient test for screening metallo betalactamase - producing Gram negative bacteria by using thiol compounds. J. Clin. Microbiol., 38:40-43, 2000.
13. BUSH, K. New Betalactamase in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clinical Infect. Dis, 32:1085-1089, 2001.
14. MENEZES e SILVA, C. H. P. & SALVINO, C. R. Importância do reconhecimento das enterobactérias hospitalares produtoras de BetaLactamase de Espectro Estendido (ESBL) e suas implicações terapêuticas. NewsLab, 41:105-12, 2000.
15. BLATT, J. M. - Mecanismo de resistência e detecção das betalactamases de espectro ampliado. NewsLab. 40:86-96,2000.
16. SALLES J. M. C.; SALLES M. J. C. - Antimicrobianos - Quando indicar Como usar. Editora Universitária UFPA, Belém., p 23-25. 2000.
17. TAKAHASHI, A.; POURNARAS, S.; WOODFORD, N.; PAPELOU, M. F.; BABINI, G. S.; DOUBOYAS, J.; LIVERMORE, D. M. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 Carbapenemase. J. Clin. Microbiol. 38:1290-1293, 1999.
18. PHELPS DL, ROSEBAUM AL, LISENBERG SL, et al. - Tocopherol efficacy and safety for preventing rethymo pathy of prematurity - A randomized controlled double masked trial. Pediatrics, 79:488-500, 1995.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Everardo Albuquerque Menezes
Rua Juazeiro do Norte, 199/302 Meireles
CEP: 60.165-110 - Fortaleza - Ceará
E-mail: menezes@ufc.br

Título de Especialista em Análises Clínicas

O TEAC – Título de Especialista em Análises Clínicas, é um documento outorgado pela SBAC – Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, no qual somente os profissionais que exercem as Análises Clínicas, e que sejam legalmente habilitados para assumirem a responsabilidade técnica por Laboratórios Clínicos, de acordo com a legislação federal vigente no país, é que podem prestar o Concurso para obter o Certificado do Título de Especialista em Análises Clínicas.

Os candidatos para se inscreverem no Concurso do TEAC, deverão solicitar regulamento e ficha de inscrição na SBAC-Nacional ou Regionais/Delegacias, por fax, telefone, e-mail, carta ou pessoalmente.

Condições para inscrição no Concurso do TEAC:

1. Os candidatos habilitados a prestarem o Concurso são: Farmacêutico-bioquímico, Médico e Biomédico.
2. Ser sócio da SBAC efetivo e estar em dia com os seus deveres estatutários.
3. Preencher ficha de inscrição, colocando quais as matérias de peso 03 e 02.
- 3.1 O candidato obrigatoriamente terá que escolher as matérias de peso 03 e 02, a peso 03 deverá ser a matéria de maior conhecimento do candidato, e peso 02 a Segunda matéria de maior conhecimento do candidato, as outras matérias contarão como peso 01.
4. Pagar taxa de inscrição do concurso.
5. Para os inscritos no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, haverá desconto de 50% na taxa de inscrição do Concurso do TEAC.
6. Após estes procedimentos, o candidato tem direito de receber o Programa do Concurso (impresso ou em disquete).

As Disciplinas:

1 – De acordo com o Programa o Candidato é avaliado pela Banca Examinadora do Concurso, no qual terá que ser aprovado nas seguintes Especialidades das Análises Clínicas:

- Bioquímica Clínica;
- Hematologia Clínica;
- Imunologia Clínica;
- Microbiologia Clínica;
- Parasitologia Clínica.

2 – O conteúdo programático do Controle da Qualidade e da Segurança, é aplicado a essas disciplinas.

3 – Excepcionalmente o candidato também poderá ter o apostilamento de Citologia Esfoliativa no Certificado do TEAC. Neste caso, o candidato também terá que se inscrever no Concurso para obtenção do TECC - Título de Especialista em Citologia Clínica, pela SBCC – Sociedade Brasileira de Citologia Clínica, sendo aprovado receberá o certificado pela SBCC.

4 – Tendo sido aprovado no Concurso para obtenção do TECC, e no Concurso para obtenção do TEAC, o Certificado do Título de Especialista em Análises Clínicas, terá o apostilamento em Citologia Esfoliativa no verso do Certificado.

5 – Não tendo sido aprovado no Concurso para obtenção do TECC, e sendo aprovado no Concurso do TEAC, o candidato terá o Certificado do Título de Especialista em Análises Clínicas, sem o apostilamento em Citologia Esfoliativa.

6 – Os portadores do Título de Especialista em Análises Clínicas, que se submeterem à prova para obtenção do TECC, pela SBCC e forem aprovados, terá seus Títulos apostilados no verso a especialidade de Citologia Esfoliativa.

As Provas:

O Concurso do TEAC é composto das Provas Escritas, Práticas de Conhecimento (dissertativa, oral e slide) e de Títulos (exercício profissional e atualização de conhecimentos).

Obs: a avaliação em Citologia pela SBCC, será Prova Escrita, Prática e Avaliação curricular.

Avaliação da Prova de Títulos a Outorga do TEAC:

Os Candidatos aprovados terão que enviar no prazo máximo de 2 anos (de acordo com o Regulamento do TEAC), Currículo e cópia de documentação comprobatória de exercício profissional e atualização de conhecimentos.

Validade do TEAC:

O TEAC é um documento que tem validade de 05 (cinco) anos, e de acordo com o seu Regulamento após 5 (cinco) anos da data de outorga ou da data da última renovação do Título de Especialista o profissional terá que comprovar que continua exercendo a profissão e que se atualizou nos últimos cinco anos, enviando os documentos que somem 2.000 pontos de acordo com o Capítulo III – Da Avaliação, Artigo 8º, do Regulamento do TEAC.

O Portador do TEAC que, na renovação não atingir o valor de pontos determinado no Regulamento, poderá submeter-se as Provas de Conhecimentos, que serão avaliadas, de acordo com o item 1 do Artigo 8º.

Próximo Concurso do TEAC:

Está previsto para ser realizado o 68º Concurso para Outorga do TEAC, em 01/05/2008, durante o 1º Congresso Sul Brasileiro de Análises Clínicas, em Florianópolis – SC, no horário de 08 às 12h (Prova Escrita/Slide) e 13:30 às 18h (Prova Oral).

Obs: O Concurso do TEAC em Florianópolis-SC, somente será realizado se houver no mínimo 40 candidatos inscritos e não podendo ultrapassar este total.

O prazo de recebimento das fichas de inscrição para este Concurso será até o dia 15/04/2008 (data de postagem).

O valor da taxa de inscrição para o Concurso do TEAC é de R\$ 198,00, excepcionalmente para este Concurso os inscritos no 1º Congresso Sul Brasileiro de Análises Clínicas, terão desconto de 50% ficando em R\$ 99,00.

Informamos, que caso o 68º Concurso do TEAC não seja realizado durante o evento em Florianópolis - SC, o mesmo acontecerá em 27/09/2008, durante o 35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e 8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, em Fortaleza – CE, no horário de 08 às 12h (Prova Escrita/Slide) e 13:30 às 18h (Prova Oral).

A taxa de inscrição para o Concurso do TEAC é no valor R\$ 198,00 (cada). Para os inscritos no 35º CBAC e 8º CBCC, haverá desconto de 50% nas inscrições.

O prazo de recebimento das fichas de inscrição para o Concurso do TEAC será até o dia 06/09/2008, (data de postagem).

Lembramos que a ficha de inscrição e o pagamento da taxa para o 68º Concurso do TEAC, deverão ser enviados para a SBAC-Nacional, Rua Vicente Licínio, 99 – Tijuca – 20270.902 – RIO DE JANEIRO – RJ.

Para o candidato que desejar se preparar para o TEAC 2008, a SBAC disponibiliza aos interessados: o Programa TEAC e o Regulamento TEAC.

Para fazer sua inscrição deverá solicitar ficha, através dos tel./fax (21) 2187-0800 e 2187-0805 ou do e-mail: teac@sbac.org.br

**No caso de dúvida e esclarecimentos,
entre em contato conosco:
SBAC, através dos tel./fax (21) 2187-0800 e 2187-0805 ou
através do e-mail: teac@sbac.org.br
SBCC, através dos tel./fax (62) 3229-0468 e 3223-5661 ou
através do e-mail: sbacgo@terra.com.br**

Estudo epidemiológico das dermatofitoses em instituições públicas da cidade de Barretos, São Paulo, Brasil*

Dermatophytosis epidemiologic study in public institution of Barretos city, São Paulo, Brazil

Cátia Rezende¹, Graziela Porsani Borsari¹, Alessandra Cristina Fontes da Silva¹ & Fernanda Regina Cavalcanti¹

RESUMO - As dermatofitoses são infecções superficiais capazes de produzir lesões em tecidos queratinizados, como pele, pêlo, e unhas. Foram examinados 536 indivíduos procedentes de Barretos, com suspeita clínica de infecções fúngicas, no período de Novembro de 2002 a Outubro de 2003, verificando-se a incidência e a etiologia das dermatofitoses. Material coletado de várias regiões corpóreas foram examinados em microscopia com KOH 10% e cultivados em agar Sabouraud. O microcultivo permitiu identificar o *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Trichophyton tonsurans* e *Epidermophyton floccosum*. Quanto à localização das lesões, os membros inferiores, pés (55%) e unhas (15%) foram as regiões mais acometidas. Foi analisada a distribuição corporal das lesões de dermatofitoses com os respectivos agentes etiológicos encontrados.

PALAVRAS-CHAVE - dermatofitoses, etiologia, epidemiologia.

SUMMARY - Dermatophytoses are superficial infections that may lead to lesions of keratinized tissues, like skin, hair and nails. A total of 536 individuals from Barretos, SP, with suspected dermatophytic lesions were examined over a period of November (2002) to October (2003) in order to determine the incidence and etiology of dermatophytosis. Material collected from different body parts was submitted to direct microscopic examination using KOH, cultured in Sabouraud agar. Microscopically examined of colony morphology identified *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Trichophyton tonsurans* and *Epidermophyton floccosum*. Concerning the location of the lesions, the inferior limbs, feet (55%) and nails (15%) were the most frequently found clinical pattern in the majority of patients. The distribution of the different infected body sites was determined in terms of the respective etiologic agents found.

KEYWORDS - dermatophytosis, etiology, epidemiology.

INTRODUÇÃO

Dermatófitos são um grupo de fungos queratinofílicos estreitamente relacionados, capazes de invadir tecidos queratinizados de humanos e animais, causando infecções denominadas dermatofitoses (37).

Os dermatófitos são classificados em três Gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, podendo ser também identificados com base na sua origem: antropofílico (humanos), zoofílicos (animais) e geofílicos (solo) (35).

A distribuição geográfica dos dermatófitos mostra-se bastante variável; enquanto alguns são cosmopolitas, a distribuição de outros depende dos seguintes fatores: adaptação ao meio ambiente, deslocamento humano, convívio com animais domésticos, aspectos sócio-econômicos, sexo, idade e imunidade do hospedeiro, promovendo variações no espectro destes fungos, de região para região (35, 39).

Os dermatófitos constituem o grupo de fungos mais frequentemente isolados em laboratórios de Micologia. Estima-se que 10 a 15% da população humana poderão ser infectadas por estes microrganismos no decorrer de sua vida (27, 33, 35). O presente estudo caracteriza os agentes etiológicos e o tipo de lesão predominante em crianças na idade escolar na região de Barretos, São Paulo, no período de Novembro de 2002 a Outubro de 2003; sendo importante para a saúde pública, dada à necessidade do conhecimento dos agentes etiológicos das dermatofitoses, em determinado meio, que variam ao longo do tempo e com as condições socioeconômicas, associada à não obrigatoriedade de notificação no Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram investigadas 536 crianças (entre 2 a 14 anos) em 8 Instituições Públicas de Barretos – S.P., sendo coletadas um total de 120 amostras clínicas. Espécimes clínicos de lesões sugestivas de dermatofitoses foram coletados (pele, cabelo, unha) usando bisturi estéril. Foram obtidos os seguintes dados dos pacientes: nome, idade, raça, sexo, material clínico e sítio anatômico. As amostras foram processadas no Laboratório de Microbiologia Clínica das Faculdades Unificadas da Fundação Educacional de Barretos.

Os espécimes clínicos foram processados de acordo com sua origem no sítio de infecção, sendo analisado segundo a morfologia em exame direto com KOH 10% (hidróxido de potássio) mais Dimetilsulfóxido (DMSO). O material clínico foi cultivado em ágar Sabouraud dextrose acrescido de clo-ranfenicol (0,05%) e ágar Micobiotic, incubados a temperatura ambiente por aproximadamente 30 dias.

A identificação, do Gênero e Espécie de dermatófitos, foi baseada nas características macro e microscópicas das colônias, bem como no microcultivo em ágar Batata ou Lactimel. Testes adicionais tais como: perfuração do cabelo *in vitro* e prova da urease foram usados para diferenciar *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*.

Colônias de *Trichophyton sp*, confirmadas após o microcultivo, foram cultivadas no ágar Uréia de Christensen e incubados à temperatura ambiente por até 7 dias. Este teste avalia a produção da enzima urease pelo fungo que degrada a uréia, presente no meio, em amônia e carbamato. O pH inicial do meio é neutro e após o crescimento do fungo e pro-

Recebido em 21/03/2007

Aprovado em 18/05/2007

¹Curso de Farmácia-Bioquímica das Faculdades Unificadas da Fundação Educacional de Barretos.

*Laboratório de Microbiologia Clínica das Faculdades Unificadas da Fundação Educacional de Barretos

dução da urease, ocorre alcalinização com alteração da cor inicial do mesmo, passando de amarelo para rosa. Na prova negativa não ocorre alteração da cor do meio. *Trichophyton mentagrophytes* são fortemente positivos, antes de 7 dias e o *Trichophyton rubrum* são negativos ou fracamente positivos (alteração da cor após 14 dias de incubação).

O teste de perfuração do cabelo *in vitro* avalia a presença ou ausência da perfuração do cabelo pelo fungo. Fios de cabelos foram colocados em placa de Petri e esterilizados por autoclavagem a 120°C por 10 minutos. Em seguida, foram colocados 25mL de água destilada estéril e adicionados 2 a 3 gotas de extrato de levedura. A avaliação dos fios de cabelos foram feitas em 4 semanas. O *Trichophyton mentagrophytes* penetra dentro do pêlo e o *Trichophyton rubrum* não perfura o pêlo.

RESULTADOS

Das 536 pessoas investigadas, durante o período de Novembro de 2002 a Outubro de 2003, 48 apresentaram dermatofitoses. Foram coletadas, 120 espécimes clínicos (de alguns pacientes foram coletados mais de um tipo de espécimes clínicos) incluindo raspado de pele, unhas e pêlos, desses 5 apresentaram resultados positivos para dermatófitos. Ao relacionar a prevalência de dermatofitose com os sexos, foi verificado que a incidência é maior em homens, apresentando 30 casos, do que em mulheres (18 casos).

O sítio anatômico mais infectado foi os interdígitos com 28 casos. A partir de todos os espécimes positivos para dermatófitos (n=51), encontraram-se 8 casos na região dos interdígitos, 6 casos nas costas, 4 casos no couro cabeludo, 4 casos nas pernas e 1 caso nas mãos (Figura 1).

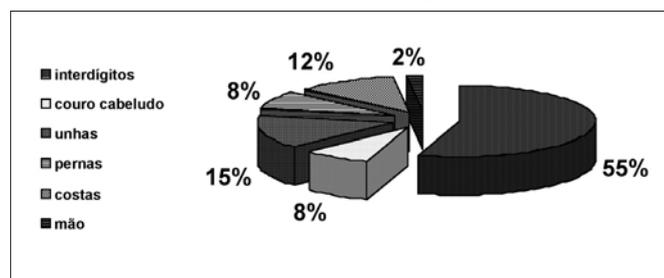


Figura 1 - Prevalência dos sítios anatômicos infectados pelos dermatófitos em Instituições de Barretos - SP

O *Trichophyton rubrum* foi a espécie mais freqüente com 34 casos, seguido por *Trichophyton mentagrophytes* com 9 casos, *Microsporum canis* com 6 casos, *Trichophyton tonsurans* e *Epidermophyton floccosum*, ambos com 1 caso, cada um (Figura 2).

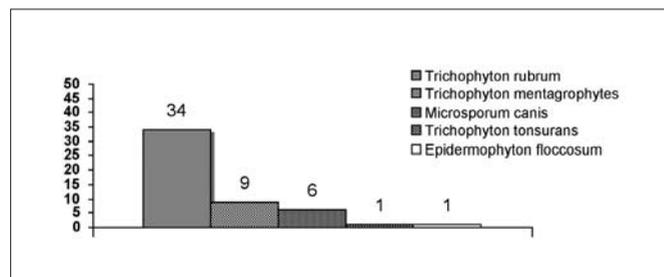


Figura 2- Prevalência de espécies de dermatófitos isolados em 51 culturas positivas.

Correlacionando-se as espécies isoladas com os respectivos sítios anatômicos infectados, observou-se que os dermatófitos que prevaleceram nos interdígitos foram: *Trichophyton rubrum* com 22 casos, *Trichophyton mentagrophytes* com 5 casos, *Epidermophyton floccosum* com 1 caso. Já no couro cabeludo prevaleceram, *Microsporum canis* com 3 casos e *Trichophyton tonsurans* com 1 caso. Nas unhas foram isolados, *Trichophyton rubrum* com 6 casos, *Trichophyton mentagrophytes* com 2. Nas pernas prevaleceram o *Microsporum canis*, 3 casos, enquanto, *Trichophyton rubrum* apresentou 1 caso. Nas costas, *Trichophyton rubrum* prevaleceu com 4 casos e *Trichophyton mentagrophytes*, com 2 casos. Entretanto, nas mãos o *Trichophyton rubrum* foi o único isolado (Figura 3).

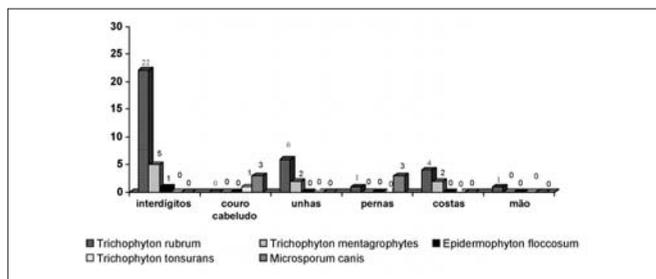


Figura 3 - Distribuição das espécies de dermatófitos segundo o sítio anatômico cometido em 48 isolados clínicos

DISCUSSÃO

A presente pesquisa revelou um índice de 9% de dermatofitoses no grupo populacional estudado. Embora esse dado seja inferior ao das estatísticas mundiais (3, 13), ele pode não corresponder exatamente o problema em nosso meio, uma vez que no Brasil as dermatofitoses não são doenças de notificação obrigatória. Estudos realizados em diferentes regiões do Brasil têm demonstrado elevados índices de dermatofitoses (6, 8, 22, 26).

O sítio anatômico mais infectado foram os pés (região dos interdígitos) (55%), provavelmente devido a maior umidade e má higienização dos mesmos, seguido das lesões de unha (15%), estando de acordo com dados da literatura que demonstram estes locais entre os mais acometidos (8, 9, 11, 12, 21, 24, 31). Neste estudo, as lesões nas costas tiveram grande prevalência (12%), estando de acordo com dados apresentados por Fernandes *et al.* (14), Ng *et al.* (30) e Davel *et al.* (10).

O termo tinea do pé (*Tinea pedis*) é usado para englobar, clinicamente, diferentes infecções que atingem a pele dessa região; essas podem acometer os interdígitos e região plantar. Estudo desenvolvido por Lopes *et al.* (21), no período de 1988-1997, demonstrou que a tinea do pé é a forma mais comum das dermatofitoses, podendo simular outras doenças da pele e tende a se tornar crônica. A casuística desta pesquisa apontou uma alta incidência desta, o que pode ser explicado pelo hábito da população em usar sapatos fechados tornando um meio propício (umidade e temperatura) para o desenvolvimento de dermatófitos.

Onicomicose (*Tinea unguium*) é definida como infecção

fúngica da unha, representando 20% de todas as desordens que a acometem. Os agentes etiológicos: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Epidermophyton floccosum*, são os mais frequentemente isolados. Das espécies causadoras de onicomicose, o *Trichophyton rubrum* foi o mais prevalente, com 75% dos casos, reforçando os dados da literatura mundial que apontam esse fungo como o mais cosmopolita e implicado na gênese das dermatofitoses (2, 7, 8, 12, 17, 30, 31, 32, 36). A epidemiologia da onicomicose é uma combinação de vários fatores que incluem: apresentação clínica, agente etiológico, história do paciente, entre outros (27). Dados relativos à incidência de onicomicose são conflitantes, variando de 2% nos EUA a 13% na população da Finlândia (11). Comparativamente a essas estatísticas, houve uma incidência de 15% de onicomicoses dermatofíticas nas unhas dos pés na população estudada.

A tinha do corpo (*Tinea corporis*), na região das costas, apresentou uma frequência de 12% e as espécies de dermatofitos encontradas foram: *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*, sendo estes os mais frequentemente isolados (4, 6, 10, 14, 30). Lacaz *et al.* (20) registraram o primeiro caso de dermatofitose por *Trichophyton raubitschekii* em paciente com lesões de tinha do corpo localizada nas nádegas.

Nas infecções do couro cabeludo, observou-se que houve o predomínio do *Microsporum canis*, sendo este o dermatofito mais envolvido na tinha dessa região (*Tinea capitis*); *Trichophyton tonsurans* ocupou o segundo lugar, estando de acordo com dados encontrados em outros estudos (8, 10, 14, 16, 18, 22, 25). No Brasil, os agentes etiológicos principais são: *Trichophyton tonsurans* nas regiões Norte-Nordeste e *Microsporum canis* no Sul e Sudeste do País. (25). Estudos demonstram que a distribuição das espécies de dermatofitos varia ao longo do tempo e de acordo com a região, refletindo as condições socioeconômicas da população; adaptando-se às condições de determinados ecossistemas, sendo considerado de importação, isto é, não fazendo parte da microbiota dermatofítica própria do lugar (1, 15, 37, 38). AQUINO *et al.* (1) analisaram pacientes com suspeita clínica de tinha do couro cabeludo em João Pessoa, Paraíba; o dermatofito isolado com maior frequência foi o *Trichophyton rubrum* (37,7%), seguido por *Trichophyton tonsurans* (28,3%), *Microsporum canis* (24,5%), *Trichophyton verrucosum* (7,5%) e *Trichophyton mentagrophytes* (1,9%), salientando diferenças epidemiológicas quando comparados com resultados da Região Sudeste.

BERGSON & FERNANDES (5) investigaram a frequência de portadores assintomáticos e doentes entre 79 coabitantes com 56 crianças apresentando tinha do couro cabeludo, no período de fevereiro de 1998 a fevereiro de 1999. A detecção do estado de portador assintomático (2,5%), sendo isolados *Trichophyton tonsurans* e *Microsporum canis*, tem importância primordial no controle desta infecção.

As infecções nas pernas e mãos apresentaram prevalência de 8% e 2%, respectivamente. *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum* foram os agentes etiológicos isolados das pernas e este, o único isolado de amostras obtidas das

mãos. Dados da literatura demonstram que o *Trichophyton rubrum* é o dermatofito mais frequentemente isolado desses sítios anatómicos (4, 8).

Estudos epidemiológicos no Brasil têm mostrado o predomínio de *Trichophyton rubrum* (9, 28, 32). Costa *et al.* (9) analisaram 6.068 casos suspeitos de dermatofitoses em Goiânia-Go, durante o período de 1993 a 1997, desses 1.595 foram positivos para dermatofitos. *Trichophyton rubrum* foi isolado de 37,5% dos casos, seguido de *Trichophyton mentagrophytes* (36,4%) e *Microsporum canis* (16%). Além disso, os dermatofitos encontrados produziram lesões no pé (30,5%), na região inguinal e crural (17,8%) e na região da pele glabra (15,5%). Estudo posterior, realizado no período de Janeiro a Dezembro de 1999, confirmou os dados referentes à prevalência dos agentes etiológicos; entretanto, com relação à localização das lesões, os membros inferiores, juntamente com o couro cabeludo foram os locais mais acometidos (7). Em Porto Alegre-RS no período de 1981 a 1995, um estudo mostrou o predomínio de *Trichophyton rubrum* (55,33%), e em segundo lugar o *Trichophyton mentagrophytes* (21,46%) (28). Estudo realizado em Florianópolis-SC, durante os anos de 1995 e 1996, em que foram analisados 946 pacientes, 249 apresentaram dermatofitoses. A incidência de *Trichophyton rubrum* foi de (58,6%), seguido de *Trichophyton mentagrophytes* (25,3%), *Epidermophyton floccosum* (7,2%), *Microsporum canis* (4,8%), *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton violaceum* (1,6%) e *Microsporum gypseum* (0,8%) (34). A epidemiologia das dermatofitoses na cidade de Fortaleza foi realizada, avaliando 2297 pacientes com lesões suspeitas de dermatofitoses. 23,2% dos pacientes foram positivos para dermatofitoses, onde o *Trichophyton rubrum* foi o agente mais prevalente (49,6%), seguido de *Trichophyton tonsurans* (34,4%), *Microsporum canis* (7%) e *Trichophyton mentagrophytes* (6,2%). Correlacionando as espécies com o sítio anatómico infectado, foi observado um predomínio de *Trichophyton tonsurans* em lesões do couro cabeludo e *Trichophyton rubrum* em lesões corporais. Estes resultados diferem dos dados estatísticos na região Sul e Sudeste no Brasil, que demonstram o *Microsporum canis* como o agente mais freqüente na tinha do couro cabeludo (4).

Através deste estudo, foi possível caracterizar as espécies de dermatofitos mais envolvidas nas dermatofitoses do nosso meio, observando que o *Trichophyton rubrum* é a espécie mais cosmopolita desse grupo fúngico, tendo sido isolado em mais da metade dos casos, seguido pelo *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Trichophyton tonsurans* e *Epidermophyton floccosum*. As espécies *Trichophyton violaceum* e *T. verrucosum* não foram isoladas em nosso estudo, sendo descritas apenas esporadicamente (6).

Dados da literatura mundial demonstram diferenças epidemiológicas das dermatofitoses, podendo estar relacionadas com condições sócio-econômicas, higiênicas e ambientais (13, 18, 19, 24, 29, 37). Com isso, pode-se concluir que os resultados obtidos com o nosso estudo estão de acordo com a maioria dos estudos epidemiológicos realizados no Brasil.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, P. M. L. P.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P. Tinea capitis em João Pessoa: visão socioeconômica. *An. Brás. Dermatol.*, 78(6):713-717, 2003.
- ASTE, N.; PAU, M.; ASTE, N.; BIGGIO, P. Tinea pedis observed in Cagliari, Italy, between 1996 and 2000. *Mycoses*, 46(1-2):38-41, 2003.
- AWODERU, V.A.; NEBO, G.C.; OTUDERO, V.O. Occurrence of dermatomycoses and in-vitro therapeutic efficacy of three antifungal drugs on the growth of *Epidermophyton floccosum*. *Mycopathologia*: 156: 295-301, 2003.
- BENAVIDES, M.I.; MONCADA, X.; OLATE, C.; VOGEL, M.; RODRIGUEZ, B. Laboratory diagnosis of dermatophytosis: 10 years experience in the western area of Santiago. *Rev. Med. Chil.*, 119(9): 1029-32, 1991.
- BERGSON, C.L. & FERNANDES, N. C. Tinea capitis: estudo de portadores assintomáticos e doentes adolescentes, adultos e idosos coabitantes com crianças com a infecção. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo*, 43(2): 87-91, 2001.
- BRILHANTE, R.S.; PAIXÃO, G.C.; SALVINO, L.K.; DIOGENES, M.J.; BANDEIRA, S.P.; ROCHA, M.F.; DOS SANTOS, J. B.; SIDRIM, J.J. Epidemiology and ecology of dermatophytoses in the City of Fortaleza: Trichophyton tonsurans as important emerging pathogen of Tinea capitis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 33:417-25, 2000.
- BROOKS, K.E. & BENDER, J. F. Tinea pedis: diagnosis and treatment. *Clin. Pediatr. Med. Surg.* 13: 31-46, 1996.
- COSTA, M.; PASSOS, X.S.; SOUZA, L.K.H.; MIRANDA, A. T. B.; LEMOS, J. A.; JÚNIOR, J. G. O., and SILVA, M. R. R. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(1): 19-22, jan-fev, 2002.
- COSTA, T.R.; COSTA, M.R.; SILVA, M.R.R.; SILVA, M.V.; RODRIGUES, A.B.; FERNANDES, O.D.L.; SOARES, A.J.; SILVA, M.J. Etiologia e epidemiologia das dermatofitoses em Goiânia-Go. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32:367-371, 1999.
- DAVEL, G.; PERROTTA, D.; CANTEROS, C.; CORDOBA, S.; RODERO, L.; BRUDNY, M.; ABRANTES, R. *Rev. Argent. Microbiol.*, 31(4):173-81, 1999.
- ELEWSKI, B.E. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin. Microbiology Rev.*, 11(3): 415-29, 1998.
- FAERGEMANN, J.; BARAN, R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. *Br. J. Dermatol.*, 149(s65):1-4, 2003.
- FALAHATI, M.; AKHLAGHI, L.; LARI, A.R.; ALAGHEHBANDAN, R. Epidemiology of dermatophytoses in an área south of Tehran, Iran. *Mycopathologia*, 156(4):279-87, 2003.
- FERNANDES, N. C.; AKITI, T., and BARREIRO, M. G. C. Dermatophytoses in children: study of 137 cases. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 43(2):83-85, 2001.
- GHANNOUM, M.; ISHAM, N.; HAJJEH, R.; CANO, M.; AL-HASAWI, F.; YE-ARICK, D.; WARNER, J.; LONG, L.; JESSUP, C.; ELEWSKI, B. Tinea capitis in Cleveland: survey of elementary school students. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 48(2):189-93, 2003.
- GURTLER, T. G. R.; DINIZ, L. M.; NICCHIO, L. Microepidemia de tinha do couro cabeludo por *Microsporum canis* em creche de Vitória – Espírito Santo. *An. Bras. Dermatol.*, 80(3):267-272, 2005.
- INGORDO, V.; FRACCHIOLLA, S.; FIGLIOLA, F.; D'ANDRIA, G.; COLECHIA, B.; NALDI, L. Prevalence and awareness of tinea pedis in Italian sailors. *Dermatology*, 201(4):349-50, 2000.
- KHOSRAVI, A.R.; AGHAMIRIAN, M.R.; MAHMOUDI, M. Dermatophytoses in Iran. *Mycoses*, 37(1-2):43-8, 1994.
- KOLIVRAS, A.; LATEUR, N.; DE MAUBEUGE, J.; SCHEERS, C.; WIAME, L.; SONG, M. Tinea capitis in Brussels: epidemiology and new management strategy. *Dermatology*, 206(4): 384-7, 2003.
- LACAZ, C. S.; ZAITZ, C.; RUIZ, L. R., et al. Dermatofitose por *Trichophyton raubitschekii*. Registro do primeiro caso em São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo*, 41(5):313-317, 1999.
- LOPES, J. O.; ALVES, S. H.; MARI, C. D. et al. Um estudo de dez anos sobre a tinha do pé na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo*, 41(2):75-77, 1999.
- LOPES, J.O., ALVES, S.H., BENEVENGA, J.P. Dermatofitoses humanas no interior do Rio Grande do Sul no período 1998-1992. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo*, 14:115-119, 1994.
- LOPES, J.O.; ALVES, S.H.; MARI, C.R.; OLIVEIRA, L.T.; BRUM, L.M.; WESTPHALEN, J.B.; FURIAN, F.W.; ALTERMAM, M.J. A tem-year survey of onychomycosis in the central region of the rio grande do sul, brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 41(3): 147-9, 1999.
- LUPA, S.; SENEZCKO, F.; JESKE, J.; GLOWACKA, A.; OCHECKA-SZYMANSKA, A. Epidemiology of dermatomycoses of humans in central Poland. Onychomycosis due to dermatophytes. *Mycoses*, 42(11-12):657-9, 1999.
- MARQUES, S. A.; CAMARGO, R. M. P.; FARES, A. H. G., et al. Tinea capitis: epidemiologia e ecologia dos casos observados entre 1983 e 2003 na Faculdade de Medicina de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *An. Bras. Dermatol.*, 80(6): 597-602, 2005.
- MATTÊDE, M.G.S., COELHO, C.C., MATTEDE, A.F., PERIN, F.C., JUNIOR L.P. Etiologia das Dermatofitoses em Vitória-ES. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, 61:177-182, 1986.
- MAZÓN, A., SALVO, S., VIVES, R., VALCAYO, A., SABALZA, M.A. Studio etiológico y epidemiológico de las dermatofitosis en Navarra (España). *Revista Iberoamericana de Micología*, 14:65-68, 1997.
- MEZZARI, A. Frequency of Dermatophytes in the Metropolitan Area of Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 40:71-76, 1998.
- MONOD, M.; JACCOUD, S.; ZAUGG, C.; LECHENNE, B.; BAUDRAZ, F.; PANIZZON, R. Survey of dermatophyte infections in the Lausanne area Switzerland. *Dermatology*, 205(2): 201-3, 2002.
- NG, K. P.; SOO-HOO, T. S.; NA, S. L.; ANG, L. S. Dermatophytes isolated from patients in University Hospital, Kuala Lumpur, Malaysia. *Mycopathologia*, 155(4):203-6, 2002.
- NG, K.P.; SOO-HOO, T.S.; NA, S.L.; and ANG, L.S. Dermatophytes isolated from patients in University Hospital, Kuala Lumpur, Malaysia. *Mycopathologia*, 155(4): 203-6, 2002.
- PEREA, S.; RAMOS, M.J.; GARAU, M.; GONZALEZ, A.; NORIEGA, A.R.; DEL PALACIO, A. Prevalence and risk factors of tinea unguium and tinea pedis in the general population in Spain. *J. Clin. Microbiol.*, 38(9):3226-30, 2000.
- PONTES, Z.B.; LIMA EDE, O.; OLIVEIRA, N.M.; DOS SANTOS, J.P.; RAMOS, A.L.; CARVALHO, M. F. Onychomycosis in João Pessoa City, Brazil. *Rev. Argent. Microbiol.*, 34(2):95-9, 2002.
- RUBIO, M.C., REZUSTA, A., TOMÁS, J.G., RUESCA, R.B. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. *Revista Iberoamericana de Micología*, 16:16-22, 1999.
- SANTOS, J. I., NEGRI, C. M., WAGNER, D. C., PHILIPI, R., NAPPI, B. P., and COELHO, M. P. Some Aspects of Dermatophytoses Seen at University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 39:137-140, 1997.
- SIDRIM, J.J.C., DIÓGENES, M.J.N., PAIXÃO, G.C. Dermatofitoses. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1999. 12:107-131..
- WEITZMAN, I. and SUMMERBELL, R. C. The Dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8:240-259, 1995.
- WEITZMAN, I.; CHIN, N.X.; KUNJUKUNJU, N.; DELLA-LATTA, P. A survey of dermatophytes isolated from human patients in the United States from 1993 to 1995. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 39:255-61, 1998.
- WILMINGTON, M.; ALY, R.; FRIEDEN, I.J. Trichophyton tonsurans tinea capitis in the San Francisco Bay area: increased infection demonstrated in a 20-year survey of fungal infections from 1974 to 1994. *J. Med. Vet. Mycol.*, 34(4): 285-7, 1996.
- ZAIAS, N. & REBELL, G. Chronic dermatophytosis syndrome due to *Trichophyton rubrum*. *Int. J. Dermatol.*, 35(9):614-7, 1996.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

E-mail do autor responsável: catia_rezende@terra.com.br

A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão*

The use of molecular biology techniques in forensic genetics: a review

Analara Koch¹ & Fabiana Michelsen de Andrade²

RESUMO - Os avanços nas tecnologias de DNA surtiram um enorme impacto no campo da ciência forense. Com uma incrível sensibilidade e um alto poder de discriminação, a análise de DNA tem sido uma poderosa ferramenta para a identificação humana e investigações criminais. O presente estudo fará uma revisão sobre as técnicas de Biologia Molecular mais significativas – RFLP, VNTR, PCR e STR – que foram desenvolvidas nas últimas décadas, tendo como princípio o estudo de diferentes polimorfismos de DNA para a identificação precisa de indivíduos. Por um longo tempo, estes polimorfismos foram detectados por técnicas que possuíam como base a eletroforese. Outra técnica que também será exposta, Southern Blotting, visa a identificação de uma seqüência de bases específicas do DNA, que foi por muito tempo aplicada tanto na detecção de SNPs como de VNTRs e STRs. Além disto, será descrita a reação em cadeia da polimerase (PCR), um método laboratorial capaz de copiar milhões de vezes um segmento do DNA, que se destaca perante outras técnicas por ser um procedimento relativamente simples e fácil de realizar em laboratório, gerando resultados precisos e satisfatórios, em um curto espaço de tempo. Por fim, serão descritos os métodos automatizados que, a partir de PCR, permitem a detecção rápida de marcadores moleculares, a fim de facilitar e tornar mais precisa a identificação forense.

PALAVRAS-CHAVE - Técnicas de biologia molecular, Genética forense, Tipagem de DNA, Perfil de DNA, Investigações criminais, RFLP, VNTR, PCR, STR.

SUMMARY - The advent of DNA-based technologies promoted significant impact in the field of forensic science. According to its high sensibility and powerful discrimination, the DNA analyses have been a powerful tool to human identification and criminal investigations. The present study will be taken to produce a review about the most important techniques of molecular biology developed in recent decades, such as RFLP, VNTR, PCR and STR. These techniques are based in the study of different polymorphisms in the DNA and it could be used in the precise subjects identification. For a period, these polymorphisms were detected through techniques based in electrophoresis. Besides, other procedures will be explained, like Southern Blotting that aims to identify specific DNA sequences and could be applied in the research of SNPs, VNTRs and STRs. It will be also described the Polymerase Chain Reaction (PCR), a laboratorial method able to amplify millions of a short DNA segment. This technique has some advantages through the others because it is a simple and easy procedure to be done in laboratories, and could offer accurate and satisfactory results in a short period of time. Concluding, automated techniques based in PCR will be present that permit fast detection of molecular evidences in order to facilitate and promote reliable forensic identification.

KEYWORDS - Molecular Biology Techniques, Forensic Genetic, DNA typing, DNA profiling, Criminal investigation, RFLP, VNTR, PCR, STR.

INTRODUÇÃO

O avanço da ciência e tecnologia a nível forense teve seu ponto culminante em meados dos anos 80, quando as técnicas de identificação, fundamentadas na análise direta do ácido desoxirribonucléico (DNA), tornaram-se uma das mais poderosas ferramentas para a identificação humana e investigações criminais (BENECKE, 1997). A determinação de identidade genética pelo DNA pode ser usada para demonstrar a culpabilidade dos criminosos, exonerar os inocentes, identificar corpos e restos humanos em desastres aéreos e campos de batalha, determinar paternidade com confiabilidade praticamente absoluta, elucidar trocas de bebês em berçários e detectar substituições e erros de rotulação em laboratórios de patologia clínica (PENA, 2005). O primeiro método de utilização da análise do DNA para identificar indivíduos foi desenvolvido em meados da década de 1980 por Sir Alec Jeffreys, da Universidade de Leicester e, apesar do seu enorme poder potencial, houve sérias reservas quanto o seu uso real, pois no início, havia muitas dúvidas quanto à reprodutibilidade e à confiabilidade dos métodos (DUARTE *et al.*, 2001; BROWN, 2001). Com o conhecimento atual, ao menos duas grandes vantagens devem ser citadas sobre a tipagem molecular: o DNA possui uma alta estabilidade química mesmo após um longo período de tempo e está presente em todas as células nucleadas do organismo humano, o que facilita a obtenção do mesmo (MALAGHINI *et al.*, 2006).

As primeiras técnicas forenses de identificação humana eram convenientes apenas para análise de DNA de evidências biológicas que contivessem células nucleadas. Atualmente, com a implementação do seqüenciamento do DNA mitocondrial, essa limitação tem sido superada (LEE e LAAD, 2001). Se antes, impressões digitais e outras pistas eram usadas para desvendar crimes; hoje, são inúmeros os espécimes biológicos dos quais o DNA pode ser extraído. Podemos encontrá-lo em pequenas amostras de sangue, ossos, sêmen, cabelo, dentes, unhas, saliva, urina, entre outros fluidos, e análises cuidadosas desse material ajudam a identificar criminosos (BENECKE, 2002).

As aplicações da Biologia Molecular no laboratório criminal centralizam-se, em grande parte, na capacidade da análise do DNA em identificar um indivíduo a partir de cabelos, manchas de sangue e fluidos corporais, entre outros itens recuperados no local do crime. Essas técnicas são conhecidas como **datiloscopia genética** (*genetic fingerprinting*), embora o termo mais preciso e utilizado para designá-las seja **perfil de DNA** (BROWN, 2001). O perfil de DNA se baseia no fato de que gêmeos idênticos são os únicos indivíduos que possuem cópias idênticas do genoma humano, mas este, em indivíduos diferentes, contém muitos polimorfismos, que são posições onde a seqüência de nucleotídeos difere em cada membro da população. Para ser considerado um polimorfismo, o alelo raro de um determinado loco deve estar presente em mais de 1% dos indivíduos da população. Assim, com esta grande variação no número e no

Recebido em 27/12/2006

Aprovado em 18/10/2007

*Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brasil

¹Aluna formanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário Feevale

²Doutora em Genética e Biologia Molecular, Professora Titular de Genética Humana, Curso de Biomedicina do Centro Universitário Feevale

tipo de variações, fica possível identificar uma pessoa com base no seu padrão de polimorfismos (BROWN, 2001).

A tipagem do DNA para finalidades forenses se baseia nos mesmos princípios fundamentais e usa as mesmas técnicas que são rotineiramente empregadas em uma ampla variedade de situações médicas e genéticas, tais como: o diagnóstico e o mapeamento genético (DUARTE *et al.*, 2001). O DNA é resistente a muitas condições que destroem a maioria dos outros compostos biológicos, como as proteínas. Além disso, somente poucas células nucleadas, que contêm pequenas quantidades de DNA, são necessárias para a identificação de um indivíduo. Por essas razões, as análises diretas do DNA freqüentemente dão resultados úteis em situações em que os métodos mais antigos, como os que empregavam grupos sanguíneos e enzimas, fracassavam (DUARTE *et al.*, 2001; SCHNEIDER, 1997).

Com uma incrível sensibilidade e poder de discriminação, a análise de DNA tem sido a "figura-chave" e promete grandes progressos no campo da ciência forense (LEE e LAAD, 2001). Por possuir um alto poder de discriminação, a tipagem do DNA tem fornecido aos investigadores uma grande chance de excluir suspeitos que não estão relacionados à cena do crime (BAECHTEL e COMEY, 1996). O número de tribunais que têm aceitado evidências baseadas no DNA cresce a cada dia, levando-nos a crer que, em um futuro não muito distante, esta tecnologia será empregada em todo o Sistema Legal (PRIMORAC *et al.*, 2000). Porém, para que não ocorra nenhum tipo de erro e para a precisão dos resultados, regras rígidas de coleta e processamento das amostras devem ser adotadas (LEE e LAAD, 2001).

Nas últimas décadas, muitas técnicas foram desenvolvidas, objetivando a identificação genética precisa de indivíduos. Dentre elas, as mais significativas são: RFLP, VNTR, PCR e STR (ALBUQUERQUE, 2004). Assim, o objetivo deste artigo é descrever estas e outras técnicas relacionadas à investigação forense, ao mesmo tempo em que uma revisão de suas aplicações em diferentes situações será realizada.

COLETA E PRESERVAÇÃO DE EVIDÊNCIAS BIOLÓGICAS

A capacidade de introduzir achados de DNA no tribunal sofre um grande impacto pela coleta das provas e métodos de preservação. Do ponto de vista técnico e criminalista, o DNA pode ser coletado da maioria dos espécimes biológicos, pois sendo uma molécula estável em ambiente seco e frio, se armazenado em tais condições, tem grandes chances de resultados confiáveis (BENECKE, 2005). Protocolos de coleta de amostras detalhados têm sido previamente descritos. O método de coleta específico dependerá do estado e condição da evidência biológica. Em geral, uma quantidade significativa de material deve ser coletada para garantir a extração de DNA suficiente para os testes. No entanto, é importante preservar a coleta de sujeira adicional, gorduras, fluidos e outros materiais que possam afetar o processo de tipagem de DNA (LEE e LAAD, 2001). Deve-se, também, levar em conta que o material biológico recuperado na cena do crime pode sofrer alterações ambientais (luz, altas temperaturas, reativos químicos, etc) que poderão ocasionar quebras e alterações da cadeia de nucleotídeos e, como consequência, modificar a composição e a estrutura normal do DNA, impossibilitando a análise (BO-NACCORSO, 2004).

Cada espécime biológico deve ser recolhido de acordo com as práticas forenses estabelecidas. Uma vez que as amostras foram coletadas, elas devem ser imediatamente entre-

gues ao laboratório forense e, para minimizar a deterioração da amostra e os itens, devem ser guardados em ambiente frio e seco até que sejam submetidos à testagem (BENECKE, 2005).

Em casos de justiça, se a evidência não for documentada, coletada, embalada e preservada com muito cuidado, ela pode não preencher os requisitos legais e científicos para serem admitidos num tribunal, pois, se ela não foi apropriadamente documentada antes da coleta, sua origem pode ser questionada e se tiver sido mal coletada ou embalada, a possibilidade de contaminação aumentará, levando a uma maior possibilidade de discordância nos resultados da análise do DNA. Na perspectiva dos desafios legais, para uma confiabilidade nos resultados dos métodos aplicados, é essencial que medidas estritas de cuidados com contaminação sejam seguidas (LEE e LAAD, 2001).

Toda a atividade humana está associada a algum tipo de erro. Existem fontes potenciais de erro durante todo o estágio do processamento da prova física, desde a coleta em campo, passando pela análise no laboratório, até a interpretação dos resultados dessa análise. Nem todos os erros têm consequências prejudiciais; muitos nem tem consequências. Muitos são prontamente identificados e podem ser corrigidos. Os lapsos que mais preocupam, são aqueles que possam levar a uma falsa semelhança. Falsas exclusões são importantes, mas é improvável que levem a falsas condenações. Para conseguir resultados precisos, cuidados e atenção a detalhes, devem ser utilizados em todos os estágios do processo de identificação pelo DNA (DUARTE *et al.*, 2001).

MARCADORES MOLECULARES PARA A IDENTIFICAÇÃO HUMANA

Nos testes de determinação de identidade genética são estudadas regiões genômicas em que há variação entre pessoas normais. Essas regiões são chamadas de "polimorfismos de DNA" ou "marcadores de DNA". Nos últimos anos foram desenvolvidas diversas técnicas para estudo de diferentes tipos de polimorfismos de DNA, formando assim um verdadeiro cardápio, no qual os cientistas e laboratórios podem escolher o método mais adequado para solucionar o problema em mãos (PENA, 2005).

O método mais usado hoje em dia é o estudo de regiões repetitivas de DNA, chamadas de "minissatélites" (VNTR's) e "microsatélites" (STR's). A chave da diversidade nessas regiões é que o número de repetições varia entre indivíduos e pode ser estudada com sondas de DNA, ou através de PCR, como vem sendo feito em maior escala atualmente (PENA, 2005).

VNTRs: (do inglês *variable number of tandem repeats* ou "número variável de repetições em tandem"); também denominados de minissatélites, são polimorfismos de DNA que consistem numa série de comprimento de repetições de fragmentos de DNA. Uma região VNTR típica consiste de 500 a 1000 pb, compreendendo principalmente unidades repetidas em seqüência, cada qual com cerca de 15 a 35 pb de comprimento. Os locos VNTR são particularmente convenientes como marcadores para a identificação humana, pois possuem um número muito grande de alelos diferentes e, sendo assim, é provável que não existam dois indivíduos não aparentados que compartilhem o mesmo genótipo (THOMPSON, 1993; DUARTE *et al.*, 2001; KASHYAP *et al.*, 2004).

STRs (do inglês *short tandem repeats* ou "repetições curtas em tandem"): STRs ou microsatélites são polimorfismos muito similares aos VNTRs, mas diferindo em seu tamanho (em geral não ultrapassam 200pb) e no comprimento das

unidades de repetição em tandem, que variam de 2 a 7 nucleotídeos. Estes locos são muito abundantes no genoma humano (KASHYAP *et al.*, 2004), e cada um deles possui um grande número de diferentes alelos, inclusive maior do que o encontrado em VNTRs, o que os torna ainda mais útil para identificação humana.

Marcadores bi-alelicos: além dos minissatélites e microssatélites há dois grandes grupos de polimorfismos no genoma humano - os polimorfismos de substituição de nucleotídeos únicos (single nucleotide polymorphisms, ou SNPs) e os polimorfismos de inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos (polimorfismos de inserção - deleção; ins/del). Ambos polimorfismos apresentam a grande vantagem de que podem ser estudados em produtos de amplificação muito curtos (50 pb ou menos) e, assim, apresentam distintas vantagens sobre os microssatélites no estudo de DNA extremamente degradado (PENA, 2005). Os mais abundantes e os melhor estudados desse grupo são os SNPs. Cerca de 5,3 milhões deles foram encontrados no genoma humano, o que corresponde a um SNP a cada 600pb (XIAO J *et al.*, 2006). Recentemente, várias publicações têm analisado a possibilidade de que SNPs marcadores ins/del possam vir a substituir os STRs na identificação de criminosos. Porém, embora estes marcadores possam oferecer algumas vantagens, os bancos de dados já foram montados com microssatélites e, portanto, a facilidade de comparações entre um dado biológico e uma seqüência armazenada é muito maior para marcadores STRs. Além disto, a tipagem dos SNPs é relativamente complexa mas por outro lado, os ins/del são muito mais fáceis de serem tipados porque seus alelos diferem somente em tamanho (PENA, 2005). Na área de identificação humana, estes marcadores apresentam a desvantagem de possuírem somente dois alelos, o que torna muito maior a possibilidade de dois indivíduos compartilharem o mesmo genótipo, mesmo sem serem aparentados ou relacionadas à cena do crime. Uma maneira de superar esta desvantagem seria a tipagem de um número maior de marcadores ins/del, de maneira que fosse possível uma identificação precisa. Por muito tempo, estes polimorfismos foram detectados por técnicas que possuíam como base a eletroforese, cujos fundamentos permitiram o desenvolvimento de métodos automatizados que serão discutidos mais adiante. Assim, a primeira técnica a ser descrita neste trabalho é a de eletroforese. Logo após uma técnica que foi utilizada por um longo tempo, denominada de *southern blotting*, será brevemente descrita, tanto na detecção de SNPs como de VNTRs ou STRs. Com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR), todos os tipos de marcadores moleculares passaram a ser detectados a partir de quantidades menores de amostras, com um tempo menor e, assim, uma atenção especial será dada para esta técnica. E, por último, uma apresentação será feita sobre os métodos automatizados, que a partir do PCR detectam um grande número de marcadores em um pequeno espaço de tempo.

TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A GENOTIPAGEM DE MARCADORES GENÉTICOS

ELETROFORESE:

Por meio dessa técnica é possível separar moléculas em função da sua massa (tamanho), forma e compactação. Trata-se de uma técnica rápida, sensível e precisa. A molécula em questão, por exemplo o DNA, migra em suportes (géis de agarose ou acrilamida) por ação de uma corrente elétrica, com diferentes velocidades, dependendo do seu tama-

nho e forma. Quando submetido a um campo elétrico, as moléculas de DNA migram para o pólo positivo, pois são carregadas negativamente, e como força oposta à migração existe o atrito com o suporte (gel). Quanto maior a molécula, maior o atrito e mais lenta a migração; portanto, moléculas de tamanhos diferentes terão migrado uma distância diferente depois de algum tempo. A distância que o fragmento percorreu a partir do ponto de aplicação é comparada com a distância que outros fragmentos de tamanhos conhecidos percorreram no mesmo gel (VIEIRA, 2006). O DNA pode ser visualizado na presença de compostos intercalantes, sendo que o mais utilizado é o brometo de etídio. Em presença desse composto, o DNA emite fluorescência por exposição à luz UV e, assim, moléculas de um mesmo tamanho são visualizadas em um mesmo ponto do gel, formando uma faixa fluorescente (ZAHA *et al.*, 2003). Se na amostra submetida à corrente elétrica existir mais de um tamanho de molécula, estas serão separadas na migração e, então, serão visíveis bandas em diferentes localizações do gel. Basicamente, duas matrizes sólidas são utilizadas atualmente para eletroforese: géis de agarose e géis de acrilamida. A escolha do tipo de gel depende do tamanho do fragmento e da diferença de tamanho de diferentes fragmentos de DNA que se quer visualizar. As duas substâncias formam tramas de poros de tamanhos variáveis, possibilitando a separação dos fragmentos, que terá sua eficiência dependente da concentração do polímero e da intensidade da voltagem e amperagem aplicadas. Em qualquer um dos casos, estas substâncias são dissolvidas numa solução-tampão eletrolítica, obrigatoriamente a mesma que recobrirá o gel na cuba de eletroforese e possibilitará a passagem de corrente elétrica (Tampão de Corrida). Para eletroforese de DNA, normalmente utiliza-se o TBE (Tris-Borato EDTA) e o TAE (Tris-Acetato EDTA). Quanto à aplicação das amostras no gel, é importante ressaltar que antes disso elas são misturadas a uma outra solução (Tampão de amostra), que tem como função aumentar a viscosidade da amostra e assim impedir que esta comece a flutuar no tampão de corrida antes que a voltagem seja aplicada no sistema. Além disso, o tampão de amostra possui um corante que possibilita a visualização do andamento da corrida. Usualmente, pode-se utilizar uma mistura de Azul de Bromofenol (corante), Xileno-Cianol e Glicose (aumentam a viscosidade) dissolvidos no tampão de corrida apropriado para cada reação (VIEIRA, 2006). Para agarose são utilizadas concentrações de 0,5 a 4% no gel. Quanto maior a concentração maior a sua capacidade de distinguir fragmentos de tamanhos próximos. Já para acrilamida, normalmente, utiliza-se géis com concentrações de 4 a 25%. Estes últimos apresentam uma definição muito maior do que a agarose: um gel de 10% pode, em certas condições, separar fragmentos de DNA diferentes em tamanho por apenas um par de bases (VIEIRA, 2006). Apesar de sua versatilidade e relativo baixo nível de dificuldade de realização, a eletroforese convencional tem a desvantagem de identificar os fragmentos apenas quanto ao tamanho e não quanto à seqüência (VIEIRA, 2006).

SOUTHERN BLOTTING:

O DNA com uma seqüência de bases específica pode ser identificado por um procedimento desenvolvido por Edwin Southern, conhecido como *Southern blotting*. Esse procedimento utiliza a capacidade de a nitrocelulose ligar-se fortemente ao DNA fita simples, mas não à fita dupla. O primeiro passo é a realização de uma eletroforese com o DNA genômico total, geralmente após a clivagem com uma ou mais enzimas de restrição. Após a eletroforese do DNA fita

dupla, o gel é embebido em NaOH para converter o DNA à sua forma de fita simples. O gel é então recoberto por uma folha de nitrocelulose. As moléculas no gel são forçadas a deslocarem-se para a nitrocelulose por capilaridade que retira o líquido usando uma pilha de papel absorvente pelo outro lado da nitrocelulose. O DNA de fita simples liga-se à membrana de nitrocelulose na mesma posição em que estava no gel. Após a secagem a 80° C, que fixa o DNA permanentemente no lugar, a membrana de nitrocelulose é umedecida com uma quantidade mínima de uma solução contendo uma sonda de DNA de fita simples. Esta sonda consiste de uma seqüência de DNA conhecida, que pode incluir uma parte de um gene de interesse para alguma patologia ou, simplesmente, uma região polimórfica se a intensão for somente a discriminação entre indivíduos. Outra característica desta sonda é que a molécula de DNA fita simples está ligada a um isótopo radioativo. A nitrocelulose umedecida é mantida em uma temperatura adequada por algumas horas para permitir a renaturação, isto é, a hibridização da sonda à(s) seqüência(s) alvo. A membrana é lavada para remover a sonda radioativa não-ligada, secada, e é feita uma autoradiografia pela exposição a um filme de raio X. A posição das moléculas complementares à sonda radioativa é indicada pelo surgimento de manchas escuras no filme revelado (VOET *et al.*, 2002).

A técnica de *Southern Blotting* pode ser utilizada na identificação de polimorfismos que determinam a alteração do padrão de clivagem (devido a mutações pontuais em sítios de restrição) obtido a partir de uma determinada região do DNA (*Restriction fragment length polymorphism* – RFLP). Esses diferentes padrões são detectados utilizando-se a própria região potencialmente polimórfica como sonda. Padrões de RFLP obtidos com uma determinada sonda (usualmente de uma região de DNA repetitivo) podem ser utilizados no estabelecimento de uma “impressão digital” de DNA, que permite a diferenciação entre dois indivíduos quaisquer (ZAHA *et al.*, 2003).

Os primeiros testes usados para a detecção de minissatélites eram baseados em *Southern* e conhecidos como MLPs (*multi locus probes*), capazes de identificar polimorfismos de múltiplos locos simultaneamente. Estes testes utilizavam como sondas seqüências de repetição em tandem e, quando hibridizados por *Southern*, detectavam uma família de minissatélites, onde todos compartilham a mesma seqüência de repetição, gerando impressões digitais de DNA específicas para cada pessoa. No entanto, os padrões gerados eram complexos e essas provas não podiam ser usadas para detectar alelos de diferentes locos. Isto marcou o advento de SLPs (*single locus probes*, sonda de um único locos), que compreendia uma única seqüência de DNA flanqueada de um VNTR. Assim, dependendo do número de repetições do VNTR, era possível determinar o alelo do indivíduo. Diversos SLPs usados em uma série, poderiam gerar perfis individuais e específicos (KASHYAP *et al.*, 2004).

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A reação em cadeia da DNA-polimerase (do inglês *Polimerase Chain Reaction*) revolucionou a genética molecular por permitir a rápida clonagem e a análise do DNA. É um método *in vitro* rápido e versátil para a amplificação de seqüências-alvo de DNA definidas, presentes em uma preparação de DNA. Geralmente, o método é programado para permitir a amplificação seletiva de uma seqüência-alvo de DNA específica a partir de DNA total previamente extraído. Para permitir tal amplificação seletiva, alguma informação prévia, a respeito das seqüências-alvo, é necessária.

Essa informação é utilizada para desenhar dois oligonucleotídeos iniciadores, denominados *primers*, os quais são específicos para a seqüência-alvo e apresentam cerca de 15 a 25 nucleotídeos de extensão. Após os *primers* terem sido adicionados ao DNA-molde desnaturado, eles se ligam especificamente às seqüências de DNA complementares ao seu sítio-alvo, flanqueando e delimitando a região a ser analisada. Na presença de uma DNA-polimerase termoestável apropriada e dos quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), é iniciada a síntese de novas fitas de DNA, que são complementares a cada uma das fitas de DNA do segmento-alvo de DNA, formando, desta maneira, um fragmento de DNA com seqüência idêntica à do DNA a ser analisado, e previamente selecionado pelo par de *primers* (STRACHAN *et al.*, 2002).

Uma vez que este ciclo de duplicação molecular é repetido várias vezes, a PCR é uma reação em cadeia porque as fitas de DNA, recentemente sintetizadas, irão atuar como moldes para mais uma síntese de DNA nos ciclos subsequentes. Após cerca de 25 ciclos de síntese de DNA, os produtos da PCR irão incluir, além do DNA que iniciou a reação, cerca de 10⁵ cópias da seqüência-alvo específica, uma quantidade que é facilmente visualizada como uma banda distinta de tamanho específico quando submetida à eletroforese em gel de agarose (STRACHAN *et al.*, 2002). O processo é relativamente simples e fácil de realizar em laboratório. Os resultados podem ser obtidos em um espaço curto de tempo, freqüentemente menos do que 24 horas, em contraste com uma análise do genoma total com *Southern*, que exige até mesmo semanas.

Principais vantagens da técnica de PCR

Velocidade e facilidade de utilização: a clonagem de DNA por PCR pode ser realizada em poucas horas usando-se um equipamento relativamente simples, cuja função fundamental é a variação de temperatura em cada passo da técnica. Uma reação de PCR consiste de 30 ciclos contendo as etapas de desnaturação, síntese e pareamento, com cada ciclo individual levando em geral 3 a 5 minutos em um termociclador automatizado, o que totaliza menos de três horas para todo o processo. Evidentemente, algum tempo também é necessário para a construção e a síntese dos oligonucleotídeos que servirão como *primers*, mas isso foi simplificado pela disponibilidade de programas de computador para projetar *primers* e pela síntese comercial rápida dos oligonucleotídeos desejados (STRACHAN *et al.*, 2002).

Sensibilidade: a PCR é capaz de amplificar seqüências a partir de quantidades ínfimas do DNA-alvo e, até mesmo, do DNA de uma única célula. Esta vantagem torna a técnica particularmente útil na análise forense, quando, em muitos casos, a quantidade de material biológico, e portanto de DNA extraído de algumas amostras, é muito pequena, como em fios de cabelo ou traços de saliva em tocos de cigarro. Desta maneira, a técnica possibilita a tipagem do DNA em amostras de prova que não poderiam ser analisadas através de outras técnicas, como por exemplo o *Southern*, uma vez que esta técnica necessita de uma grande quantidade de DNA total. Além disso, a pequena quantidade de DNA, necessária para a PCR, torna mais fácil guardar porções de amostras para repetir os testes no mesmo ou em outro laboratório (DUARTE *et al.*, 2001).

Tal sensibilidade excelente tem fornecido novos métodos para o estudo da origem molecular de doenças e tem encontrado numerosas aplicações na ciência forense, no diagnóstico, na análise de ligações genéticas, utilizando a classificação de um único tipo de esperma, e nos estudos

paleontológicos em que as amostras podem conter um número insignificante de células. No entanto, a sensibilidade extrema do método implica que enormes cuidados devem ser tomados para evitar a contaminação da amostra com DNA de outras fontes (STRACHAN *et al.*, 2002).

Robustez e possibilidade de análise de amostras degradadas: a PCR pode permitir a amplificação de seqüências específicas a partir de material no qual o DNA está gravemente degradado ou embebido em um meio onde o isolamento de DNA é problemático. Como o *Southern* utiliza DNA genômico total, é necessário que este DNA esteja em bom estado, ou seja, que as moléculas estejam intactas. Mas em genética forense, nem sempre as amostras biológicas são novas e se encontram em um bom estado de conservação, o que compromete a integridade do genoma da célula a ser analisada. Uma vez que somente um fragmento do DNA é isolado e amplificado pela PCR, uma enorme vantagem desta técnica é permitir a utilização, com sucesso, de amostras que contenham DNA degradado. Assim, através da PCR, é possível a tipagem do DNA em amostras que de outra maneira não poderiam ser analisadas, como amostras antigas e já decompostas, restos mortais de vítimas de incêndios ou acidentes e corpos em decomposição, por exemplo (DUARTE *et al.*, 2001).

Principais limitações da técnica de PCR

Apesar de sua enorme popularidade, uma limitação da técnica de PCR é a questão da contaminação. Se o DNA contaminante estiver presente em níveis comparáveis aos do DNA alvo, sua amplificação pode confundir a interpretação dos resultados da tipagem, possivelmente levando a uma conclusão errônea (DUARTE e cols, 2002). Com o objetivo de minimizar esta possibilidade, algumas providências devem ser tomadas, como utilização de um controle negativo, no qual é feita a mesma reação de PCR, mas nenhuma amostra é colocada, e a separação física das áreas do laboratório destinadas para o trabalho com PCR e com produto já amplificado (BOROVNIK *et al.*, 2006).

RFLP, VNTR e STR associados à PCR

A tipagem de RFLP foi a primeira tecnologia usada em testes de DNA forense, sendo adotada para uso em diversos países. Devido à necessidade de uma grande quantidade de DNA não-degradado, a tecnologia RFLP não é mais o protocolo de escolha dos laboratórios que realizam testes de DNA forense. O método de PCR tem uma significativa vantagem sobre a técnica anterior de RFLP, baseada em *Southern*, pois necessita de uma quantidade bem menor de DNA para análise e, além disto, é um teste muito mais rápido, podendo utilizar amostras muito degradadas, tendo a certeza de resultados satisfatórios (SHULLER *et al.*, 2001). Assim, todos os polimorfismos descritos anteriormente são, atualmente, investigados através de PCR.

Quando a tipagem de DNA através de PCR é avaliada, uma série de vantagens são percebidas. A mais importante delas é a de que amostras com alto grau de degradação podem ser analisadas, uma vez que não é necessário que as moléculas de DNA estejam intactas, pois a extensão de DNA a ser investigada é pequena. Além disto, outras vantagens são também importantes como a possibilidade de utilização de pequenas quantidades de DNA, a avaliação concomitante de um grande número de locos, garantindo um maior poder de discriminação, e a rapidez do procedimento. Enquanto que, na análise de STRs através de PCR, apenas a região de interesse será amplificada: com o *Sou-*

thern, se fazia necessário que o DNA genômico inteiro estivesse no gel (KASHYAP *et al.*, 2004). Com o advento dos métodos automatizados, uma série de kits comerciais para tipagem de STRs estão disponíveis, o que demonstra a importância destes marcadores na genética forense.

SEQÜENCIAMENTO MANUAL DE DNA

O DNA pode ser seqüenciado produzindo-se fragmentos pela "interrupção controlada da replicação enzimática". A DNA polimerase é utilizada para copiar uma determinada seqüência de um DNA unifilamentar, como em uma reação de PCR comum. A diferença desta reação é que, além dos quatro desoxirribonucleosídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, marcados com radioatividade), a mistura de incubação contém um análogo 2', 3'-didesoxi de um deles. A incorporação desse análogo bloqueia o posterior crescimento da nova cadeia porque ele não tem a hidroxila 3' terminal necessária para formar a ligação fosfodiéster seguinte. Assim, são produzidos fragmentos de vários comprimentos, nos quais o análogo didesoxi está na ponta 3'. A mesma amostra é submetida à esta reação em quatro eppendorfs diferentes e em cada eppendor existe um dos quatro nucleotídeos modificados diferentes. O resultado final em cada reação são fragmentos de diferentes tamanhos, devido à parada da reação a cada vez que o nucleotídeo amplificado é incorporado. Estes conjuntos de fragmentos (um para cada análogo didesoxi) são então submetidos à eletroforese e a seqüência de bases do novo DNA é lida na autoradiografia (STRYER, 1996).

MÉTODOS AUTOMATIZADOS

Seqüenciamento automático de DNA

Com o crescimento do interesse em desvendar a totalidade dos genomas de diferentes organismos, incluindo o homem, técnicas mais sofisticadas para o seqüenciamento do DNA tiveram que ser desenvolvidas. Os seqüenciadores de DNA analisam automaticamente as fitas de DNA previamente amplificadas, cujos didesoxirribonucleotídeos (dNTPs) incorporados na PCR foram previamente marcados com compostos fluorescentes, de diferentes cores para cada dNTP. O produto da PCR é aplicado em um gel no interior de um capilar, e assim, a migração do DNA acontece até passar pelo detector do equipamento. Um feixe de laser rastreia o gel, excitando os marcadores, que emitem luz em um comprimento de onda específico, de acordo com o corante utilizado. A luz é detectada e o padrão do espectro analisado com ajuda de programas que permitem gerar as seqüências de DNA (VOET *et al.*, 2002).

Usando detectores de fluorescência controlados por computador, os sistemas automáticos podem identificar aproximadamente 10 mil bases por dia, bem mais do que as 50 mil bases por ano obtidas pelos métodos manuais (VOET *et al.*, 2002). Em genética forense, o seqüenciamento do DNA é utilizado principalmente para DNA mitocondrial, que é extremamente rico em SNPs, e sem polimorfismos do tipo VNTRs ou STRs.

Genotipagem de STRs utilizando o seqüenciador automático

Atualmente, entre as técnicas de tipagem de DNA usadas na identificação humana, a genotipagem automatizada de DNA com STR Multiplex, baseada em fluorescência é, sem dúvida, a mais informativa, precisa, robusta e de maior rapidez (KASHYAP *et al.*, 2004).

Nesta metodologia, vários STRs são amplificados utilizando-se vários pares de primers (PCR multiplex) que compõem um kit comercial. O produto da reação de amplificação dos STRs pode ser facilmente detectado através de seus res-

pectivos tamanhos, através da migração em gel de eletroforese de alta resolução, localizado dentro de um capilar, como ocorre no seqüenciamento automático. Quando utilizada a tecnologia de coloração fluorescente com detecção por laser, é possível inclusive avaliar STRs de mesmo tamanho, bastando para isto que cada um seja marcado com uma coloração diferente. Cada kit de PCR multiplex utiliza diferentes colorações, e amplifica diferentes STRs, como os kits comerciais Profiler Plus™ que analisa simultaneamente 10 marcadores, o kit Power Plex® para 16 STRs, e o Identifiler™ para 16 marcadores (KASHYAP *et al.*, 2004). A técnica para a análise de STRs utilizando laser é significativamente mais sensível em comparação a outras metodologias padrão. Geralmente é necessário apenas entre 0,5 e 2 ng de DNA para a genotipagem. Somente 1 a 2% dos produtos de 28 ciclos PCR são necessários para a tipagem alélica, o que significa que o material amplificado pode ser estocado para uma nova análise, quando necessário. Essas metodologias que utilizam fluorescência são aproximadamente 200 vezes mais sensíveis do que qualquer outra técnica de coloração (KASHYAP *et al.*, 2004).

O DNA MITOCONDRIAL NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA

Embora a grande maioria dos genes se localize no núcleo, um subgrupo pequeno, mas importante, reside no citoplasma, especificamente nas mitocôndrias. São eles os genes mitocondriais que exibem herança exclusivamente materna. Todas as células humanas possuem centenas de mitocôndrias, cada uma contendo várias cópias de uma pequena molécula circular, o cromossomo mitocondrial (THOMPSON *et al.*, 1993).

A principal vantagem do DNA mitocondrial, em comparação com o DNA nuclear, é que ele está presente num total aproximado de 500 a 2.000 cópias por célula. Nesse contexto a análise do DNAmT é particularmente útil em investigações criminais, uma vez que esta abundância oferece uma maior chance de algumas cópias suportarem a degradação das amostras obtidas para a análise forense. Apesar de o DNA nuclear possuir um ótimo poder para as identificações criminais, ele aparece com uma frequência de apenas duas cópias por célula diplóide (ALBUQUERQUE, 2004; PARSONS e COBLE, 2001).

Uma característica importante do DNA mitocondrial é que ele é herdado uniparentalmente, pois apenas as mitocôndrias do gameta materno estão presentes no embrião e conseqüentemente no indivíduo adulto. Sendo assim, as relações familiares pela linhagem materna são reconhecidas facilmente (ALBUQUERQUE, 2004; SCHULLER *et al.*, 2001).

Os alvos do seqüenciamento do DNA mitocondrial são duas regiões específicas do cromossomo, denominadas de regiões hipervariáveis I e II (HV1/HV2). A taxa de mutação nestas regiões é de cinco a dez vezes maior em comparação com o DNA nuclear. Espécimes biológicos são analisados comparando o polimorfismo encontrado nas regiões HV1 e HV2 com aqueles encontrados na linhagem materna, ou a partir de um banco de dados evolucionário, biológico ou antropológico da população, quando se deseja enquadrar um suspeito em algum grupo étnico, por exemplo, uma vez que cada população de origem distinta possui um conjunto específico de SNPs nesta região (KASHYAP *et al.*, 2004; PARSONS e COBLE, 2001).

Entretanto, deve-se levar em conta que a tipagem de DNA mitocondrial só dará um resultado correto e definitivo se a variação do DNA do indivíduo em questão for concordante com a de seus parentes maternos (PARSONS e COBLE,

2001), pois uma vez que a taxa de mutação é muito alta, uma diferença de seqüência não significa necessariamente que os indivíduos comparados não sejam relacionados.

O CROMOSSOMO Y NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA

Assim como a análise do DNAmT é muito utilizada em questões relacionadas à linhagem materna, a análise de STRs do cromossomo Y tem sido uma excelente técnica usada em identificações humanas para solucionar disputas de paternidade de filhos do sexo masculino, uma vez que o mesmo é característica única da linhagem paterna. O cromossomo Y presente no DNA nuclear, encontra-se com uma frequência de apenas uma cópia por célula e é transmitido para todos os descendentes masculinos. Investigações de STRs do cromossomo Y tem sido úteis, por exemplo, em casos de estupro, onde são encontradas misturas de secreção vaginal com sêmen (KASHYAP *et al.*, 2004).

Kits comerciais para tipagem STR-Y tornaram-se recentemente disponíveis pela empresa Relia Gene technologies, Inc. Uma característica particularmente útil destes kits é a escala alélica que permite a identificação de alelos em amostras com comparação direta. Os kits Y-PLEX™6 e Y-PLEX™5, fazem a tipagem de 6 e 5 locos de STR-Y respectivamente. O Instituto nacional de Padronização e Tecnologia (NIST) U.S.A. também desenvolveu um sistema de 20-PLEX p/ tipagem STR-Y que permite a amplificação simultânea de 20 STRs em uma única reação (KASHYAP *et al.*, 2004; WALSH, 2004).

BANCOS DE DADOS DE DNA FORENSE

Em termos de aplicações forenses específicas, de tecnologias moleculares, nada teve um efeito mais profundo do que a implementação global dos bancos de dados de DNA forense. Eles têm alterado a paisagem do sistema de justiça criminal e remodelado o campo da ciência forense, principalmente por fornecerem a chance da identificação de indivíduos e resolução de casos em que não existem suspeitos, e portanto, não existem amostras para serem comparadas com o material coletado na cena do crime. Com o fornecimento de novos desafios de mecanismos pelos quais as provas forenses podem ser utilizadas, o ônus de responsabilidade daqueles que administram seu uso, tem aumentado. Os bancos de dados necessitam de um nível apropriado de sofisticação e também um bom suporte legislativo, político e financeiro (WALSH, 2004).

O primeiro banco de dados de perfis genéticos de criminosos foi criado na Inglaterra mas, sem dúvida, o banco mais importante, criado pelo FBI nos Estados Unidos, é o Sistema de Índice de DNA Combinado (Codis). Ele começou como um projeto piloto em 1990 e ganhou impulso com o "DNA Identification Act" de 1994, que deu ao FBI a autoridade de estabelecer um banco de dados em nível nacional para fins de investigação criminal. O sistema é estruturado em laboratórios estaduais com uma coordenação central. Existem dois arquivos diferentes de perfis genéticos com objetivos complementares. O "Índice Forense" ("Forensic Index") contém atualmente 96.473 perfis genéticos obtidos a partir de cenas de crimes e o "Índice de Criminosos" ("Offender Index") contém 2.072.513 perfis genéticos de criminosos condenados por crimes sexuais e outros crimes violentos. Até dezembro de 2004, o Codis havia permitido 19 mil identificações de suspeitos, demonstrando sua grande utilidade (PENA, 2005).

O Brasil deveria estabelecer como uma prioridade nacional à implementação de um programa eficiente de determi-

nação de identidade genética que possa ajudar em investigações criminais e aumentar a segurança pública. De acordo com Pena (2005), as seguintes etapas seriam de grande importância: montar uma rede eficiente de laboratórios de DNA forense; fazer treinamento da polícia para coleta correta da evidência em cenas de crime; fazer treinamento dos profissionais que atendem nas delegacias e nos serviços de urgência médica para que possam providenciar de maneira correta a coleta de evidência de vítimas de estupro; fazer treinamento de juizes de vara criminal e promotores para entenderem os princípios da tipagem de DNA com fins forenses; montar um banco nacional de perfis genético semelhante ao Codis do FBI.

LIMITAÇÕES QUANTO AO USO DO DNA

Quando gêmeos idênticos são suspeitos de crime em que o autor deixou vestígios, o DNA em nada poderia colaborar para a elucidação do delito, uma vez que não consegue distingui-los por serem geneticamente idênticos. Neste caso a datiloscopia convencional seria útil, se dentre os vestígios deixados, existissem impressões digitais (BONACCORSO, 2004). As condições de preservação do material biológico de um cadáver carbonizado ou que tenha ficado por muito tempo submerso no mar, muitas vezes não permitem, através da análise do DNA, que se alcancem dados com significância estatística para que se possa afirmar sua identidade, ao passo que neste sentido seria mais significativo o exame de sua arcada dentária (BONACCORSO, 2004). Outro ponto importante a ser abordado sobre as limitações do DNA, principalmente na área criminal, diz respeito a peculiaridades da análise. Muitas vezes, qualquer vestígio de roupas coloridas, que possa ser encontrado nas evidências biológicas, acabam inibindo a reação de PCR (BONACCORSO, 2004). Apesar de certas limitações da análise de DNA, deve-se acima de tudo enfatizar sua importância como prova extremamente poderosa, se realizada segundo as recomendações técnicas exigidas (BONACCORSO, 2004).

CONCLUSÃO

A análise do DNA é um dos maiores progressos técnicos da investigação criminal desde a descoberta das impressões digitais. Métodos para determinar o perfil do DNA estão firmemente embasados na tecnologia molecular. Quando a determinação do perfil é feita com cuidados adequados, os resultados são altamente reprodutíveis (DUARTE *et al.*, 2001). Os métodos baseados na PCR são imediatos, requerem apenas uma pequena quantidade de material e podem fornecer identificação não-ambígua de alelos individuais. Assim, vários métodos de PCR, particularmente os que usam os STRs, estão sendo cada vez mais usados. (DUARTE *et al.*, 2001; GOES *et al.*, 2002). A tecnologia do perfil e os métodos relacionados à análise de DNA progrediram a ponto de não colocar em dúvida a admissibilidade dos dados sobre o DNA quando adequadamente coletados e analisados (DUARTE *et al.*, 2001). No futuro, espera-se que as técnicas de biologia molecular existentes sejam aprimoradas e que novos e melhores métodos para análise sejam desenvolvidos, a fim de que a grande maioria dos casos de investigações forenses cíveis e criminais tenham um desfecho que não possa ser questionado nos tribunais.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, Trícia K. Identificação humana através de marcadores moleculares. Caderno La Salle XI, Canoas, v. 2, n. 1, p. 265 - 270, 2004.
- BAECHTEL, F. Samuel.; COMEY, Catherine T. Applications of Molecular Biology to Analyses of Forensic Evidence. Biologicals, v. 24, p. 201 - 205, 1996.
- BENECKE, Mark. DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey. Naturwissenschaften, v. 84, p. 181 - 188, 1997.
- BENECKE, Mark. Coding or non-coding, that is the question. EMBO reports, v. 3, n. 6, p. 498 - 502, 2002.
- BENECKE, Mark. Forensic DNA Samples: Collection and Handling. Encyclopedia of Diagnostic and Proteomics, 2005. Disponível em: <http://www.benেকে.com/dnacollection.pdf> Acesso em: 18 mai. 2006.
- BONACCORSO, Norma. Análise Forense de DNA. São Paulo: 2004. 24p. Tese (Monografia apresentada no Concurso de Ingresso para professor da ACAD-DEPOL) - Academia de Polícia de São Paulo. Disponível em: <http://www.petrictriminal.com.br/dnaforense.htm>. Acesso em: 18 mai. 2006.
- BOROVIK, C.L.; TAJARA E.; ROCHA J.C.; FARAH L.M.S.; NACCACHE N.F.; NETTO R.C.M.; JOFFE R. Guia de boas práticas laboratoriais em citogenética e genética molecular humana - comitê de normatização e recomendações para procedimentos utilizados em laboratórios que prestam serviços na área de genética humana - sociedade brasileira de genética. Disponível em <www.sbg.org.br>. Acesso em: 13 nov. 2006.
- BROWN, T.A. Clonagem Gênica e Análise de DNA: Uma introdução. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2001. 376p.
- DUARTE, Francisco.A.M.; PEREZ, Augusto.M.; PENA, Sergio.D.; DE BARROS, Margaret. P.M.; ROSSI, Elsie O. A avaliação do DNA como Prova Forense. Ribeirão Preto: FUNPEC. 2001. 283p.
- GÓES, Andréa C. S.; SILVA, Dayse A. DOMINGUES, Cristiane S.; SOBRINHO, João M.; CARVALHO, Elizeu F. C. Identification of a criminal by DNA typing in a rape case in Rio de Janeiro, Brazil. Sao Paulo Medical Journal, v. 120, n. 3, p. 77 - 80, 2002.
- KASHYAP, V.K.; SITALAXIMI T.; CHATTOPADHYAY P.; TRIVEDI R. Dna Profiling Technologies in Forensic Analysis. Int. J. Hum. Genet, v. 4, n. 1, p. 11 - 30, 2004.
- LEE, Henry.C.; LADD, Carl. Preservation and Collection of Biological Evidence. Croatian Medical Journal, v. 42, n. 3, p. 225 - 228, 2001.
- MALAGHINI, Marcelo.; ALONSO, Carlos A.M.; DALL'STELLA, Renato.; SCHNEIDER, Vicente J. Análises de Material Genético na Investigação Criminal - um relato sobre a evolução dos processos de padronização. Disponível em: http://www.labfa.com.br/texto_infmatgencriminal.htm. Acesso em: 08 mar. 2006.
- PARSONS, J. Thomas.; COBLE, D. Michael. Increasing the Forensic Discrimination of Mitochondrial DNA Testing through Analysis of the Entire Mitochondrial DNA Genome. Croatian Medical Journal, v. 42, n. 3, p. 304 - 309, 2001.
- PENA, Sérgio D.J. Segurança Pública: determinação de identidade genética pelo DNA. In: Seminários Temáticos para a 3ª Conferência Nacional de C, T & I. Parcerias Estratégicas, v. 20, p. 447 - 460, 2005.
- PRIMORAC, Dragan.; SCHANFIELD1, Moses.S.; PRIMORAC2, Damir. Application of Forensic DNA Testing in the Legal System. Croatian Medical Journal, v. 41, n. 1, p. 32 - 46, 2000.
- SCHNEIDER, Peter M. Basic issues in forensic DNA typing. Forensic Science International, v. 88, p. 17 - 22, 1997.
- SCHULLER, Werner.; FEREDAY, Lyn.; SCHEITHAUER, Richard. Interpol Handbook on DNA Data Exchange and Practice: Recommendations from the Interpol DNA Monitoring Expert Group, v. 1, 2001, 70p.
- STRACHAN, Tom.; READ, Andrew P. Genética Molecular Humana. 2.ed. Porto Alegre: Artmed 2002. 576p.
- STRYER, Lubert. Bioquímica. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1996. 1000p.
- THOMPSON, Margaret W.; McINNES, Roderick R.; WILLARD, Huntington F. Thompson & Thompson Genética Médica. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1993. 339p.
- VIEIRA, Daniel P. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. Disponível em: <http://www.etall.hpg.ig.com.br/aula1b.pdf> Acesso em: 01 nov. 2006.
- VOET, Donald; VOET, Judith.; PRATT, Charlotte W. Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre: Artmed 2002. 931p.
- WALSH, J. Simon. Recent advances in forensic genetics. Expert Rev. Mol. Diagn. v. 4, n. 1, p. 31 - 40, 2004.
- XIAO, Junhua.; XIN Xiujian.; LUAN Xiaohui.; WEI Dongzhi.; YANG Shengli. A modified simple RFLP-PCR method for single nucleotide polymorphism (SNP) typing. Genetics and Molecular Biology, v. 29, n. 3, p. 562 - 565, 2004.
- ZAHA, Arnaldo.; SCHRANK, Augusto.; LORETO, Élgion S.; FERREIRA.; HENRIQUE B.; SCHRANK, Irene S. Biologia Molecular Básica. 3.ed. Porto Alegre: Mercado Aberto 2003. 421p.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Profa. Dra. Fabiana Michelsen de Andrade
Centro Universitário Feevale
RS 239, no. 2755
PROTEC - Prédio Lilás, sala 201 E
CEP 93352-000 Novo Hamburgo - RS
email: fabiana.andrade@feevale.br

PRÊMIO DOLES DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio Doles de Bioquímica Clínica é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC, com o patrocínio da DOLES REAGENTES;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a R\$ 3.000,00 (três mil reais), além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

- O Prêmio Doles de Bioquímica Clínica tem por objetivos;
- 11) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Bioquímica Clínica no País; e
 - 2) Premiar o melhor trabalho de bioquímica clínica inscrito e apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 11) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem word) e uma cópia em disquete (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado na íntegra, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio Doles de Bioquímica Clínica poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio Doles de Bioquímica Clínica, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 11) O Prêmio Doles de Bioquímica Clínica é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio Doles, obrigatoriamente, deve ser apresentado na sessão de Temas Livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio Doles de Bioquímica Clínica

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • 20270-902 • Rio de Janeiro • RJ

Comparação entre as células-tronco de sangue de cordão umbilical de neonatos prematuros e nascidos a termo: uma revisão

Comparison between preterm and full-term newborn umbilical cord blood stem cells: a review

Thaís L. Gomes¹ & Patricia Pranke²

RESUMO - As células-tronco são células capazes de gerar diferentes tipos celulares. Entre as fontes de células-tronco encontra-se o sangue de cordão umbilical que apresenta um grande número de progenitores hematopoéticos. Essa fonte vem sendo amplamente utilizada em transplantes devido a diversas vantagens, entre elas, a imediata disponibilidade, beneficiando pacientes com doenças hematológicas e imunológicas. Para o sucesso dos transplantes, há a necessidade de se considerar a frequência das células-tronco nas amostras de sangue de cordão umbilical. Marcadores celulares específicos como a presença da molécula CD34 e a ausência de CD38 indicam o grau de imaturidade das células-tronco hematopoéticas e, conseqüentemente, a sua grande capacidade de proliferação e diferenciação celular. Existem diferenças quanto à frequência das células-tronco no sangue de cordão umbilical entre neonatos nascidos a termo e prematuros. Essas diferenças podem ser importantes na escolha das amostras armazenadas nos bancos de sangue de cordão umbilical a serem utilizadas nos transplantes de células-tronco. Além disso, as pesquisas com células-tronco têm mostrado grande capacidade de proliferação e diferenciação em vários tecidos. O estudo das células-tronco pode ser a resposta para o tratamento de doenças cardíacas, neurológicas e imunológicas de inúmeros pacientes e, talvez, o primeiro passo para a cura.

PALAVRAS-CHAVE - Células-tronco hematopoéticas, sangue de cordão umbilical, marcadores celulares, neonatos prematuros, neonatos nascidos a termo.

SUMMARY - Stem cells are cells that have the ability to give rise to different cell types. Among the sources of stem cells, there is the umbilical cord blood, which has a great number of hematopoietic progenitors. This source has been widely used in transplants owing to its advantages like, for example, immediate availability, improving patients with immunological and hematological diseases. In order for the transplant to be successful, it is necessary to consider the stem cell frequency within the samples of the umbilical cord blood. Specific markers like the presence of CD34 molecule and the absence of CD38 indicates the immature level of hematopoietic stem cells and consequently their ability of cellular proliferation and differentiation. There are differences between the cellular frequency in umbilical cord blood from preterm and term newborn. These differences might be important in order for finding a sample stored at umbilical cord blood banks for the transplant. Nevertheless, research using stem cells has attempted that these cells have a great capacity of proliferation and differentiation into many tissues. Stem cell research offers hope for the treatment of cardiac, neurological and immunological diseases of countless patients and, perhaps, the first step to the cure.

KEYWORDS - hematopoietic stem cells, umbilical cord blood, cell markers, preterm newborn, full-term newborn.

INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas que apresentam uma grande capacidade de divisão e proliferação celular. São células capazes de se diferenciar em diversos tecidos como tecido nervoso, cardíaco, entre outros. Essas células podem ter origem do blastocisto até o 5º dia após a fecundação, sendo chamadas células-tronco embrionárias (CTE). A medula óssea (MO), o sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP), entre outros órgãos, também são fontes de CT, sendo essas denominadas células-tronco adultas (CTA) (KIRSCHSTEIN e SKIRBOLL, 2001). As CT são aptas a se diferenciar em diversos tipos celulares e tecidos, respondendo a estímulos do microambiente onde as mesmas se encontram. A alta plasticidade destaca a importância das mesmas em estudos que buscam a cura de doenças.

As células-tronco hematopoéticas (CTH) são CTA responsáveis pela reconstituição celular da medula óssea após o transplante. As CTA estão presentes na MO, no SCUP, no sangue periférico e em outros tecidos. Existem, ainda, as células-tronco mesenquimais (CTM) que vem recebendo atenção especial nos últimos anos devido a descobertas terapêuticas importantes na regeneração de diversos órgãos e tecidos, e no suporte à hematopoese. As CTM estão presentes na MO e no SCUP e em diversos outros órgãos. As CTM apresentam grande capacidade proliferativa (GANG

et al., 2004; WANG et al., 2005). As CTH apresentam uma capacidade de diferenciação mais limitada quando comparada com as CTM e as CTE.

O SCUP é considerado uma importante fonte de CT nos transplantes de células-tronco (TCT), uma vez que as células presentes em sua fração mononuclear são menos propensas a causar reações imunológicas. (KIRSCHSTEIN e SKIRBOLL, 2001). O sangue é retirado do cordão umbilical após o nascimento da criança, não oferecendo risco algum ao doador. Posteriormente, o sangue é armazenado para o transplante em bolsas com anticoagulante sob baixas temperaturas. No entanto, as amostras precisam conter uma quantidade mínima de CT para se obter um resultado satisfatório no transplante (WAGNER et al., 2002). A maioria das amostras coletadas e armazenadas em bancos de SCUP é de neonatos nascidos a termo (NNT) (SURBEK et al., 2000). Entretanto, existem na literatura estudos que comprovam a existência de uma diferença em relação à quantidade de CT existentes no SCUP de recém-nascidos (RN) prematuros e NNT (GASPARONI et al., 2000; WYRSCH et al., 1999).

Em vista da atual importância do estudo das CT e no interesse na utilização do SCUP como fonte dessas células para o transplante, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica comparando as CT do SCUP de RN prematuros e NNT, verificando diferenças quantitativas e fisiológicas quando existentes.

Recebido em 17/10/2006

Aprovado em 18/10/2007

¹Acadêmica Fac. Farmácia UFRGS

²Laboratório de Hematologia, Depto. Análises Fac. Farmácia UFRGS

1. Células-tronco

As CT são células capazes de auto-renovação e de originar diferentes tipos celulares dependendo do microambiente em que se encontram e do estímulo aos quais estão expostas. Essas células podem ser denominadas multipotentes, quando formam elementos de um determinado tecido, pluripotentes quando originam as três camadas germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme) e totipotentes quando formam todas as células e tecidos embrionários, sendo esta última característica do ovo fertilizado (KIRSCHSTEIN e SKIRBOLL, 2001).

2. Transplante de células-tronco hematopoéticas

As CTH são células que podem se auto-renovar, diferenciar-se em uma variedade de células e sofrer apoptose. As CTH residem principalmente na MO e circulam na corrente sanguínea. Já se encontram presentes no sangue fetal, diminuindo o seu número no sangue periférico após o nascimento do neonato (LI K *et al.*, 1999). O transplante das mesmas é capaz de restituir componentes do sistema hematológico e imunológico que foram danificados (KIRSCHSTEIN e SKIRBOLL, 2001).

As CTH podem permanecer criopreservadas por vários anos até sua utilização, sendo então utilizadas para tratar doenças genéticas e podendo fazer parte da terapêutica de determinadas doenças hematológicas malignas, como as leucemias, e no tratamento da anemia aplásica grave (THOMAS, 1999).

As CTH usadas nos TCT podem ser derivadas tanto dos próprios pacientes, através de um transplante autólogo, ou provenientes de outra pessoa, por um transplante alogênico. Os transplantes alogênicos utilizam, geralmente, doadores aparentados. No entanto, as chances de encontrar um doador com total compatibilidade são de apenas 25-30% necessitando, então, da utilização de doadores não aparentados. O TCT utilizando-se a medula óssea está associado a uma grande morbidade e mortalidade sendo ao redor de 10%, nos transplantes com total compatibilidade em pacientes jovens, e cerca de 40-50%, nos pacientes de idade mais avançada em transplantes não aparentados (LEWIS, 2002). As fontes de CT e a idade do receptor e doador são relevantes para o sucesso do transplante das mesmas, de forma que as células provenientes de um doador jovem são capazes de reconstituir mais rapidamente o sistema hematológico e imunológico (TRIGG, 2004). A recuperação do sistema imune deve ocorrer após o TCT, pois a sua ausência pode resultar no óbito do paciente atribuída a infecções que ocorrem pela imaturidade ou incapacidade do sistema imunológico. A neutropenia que ocorre após o transplante das células geralmente dura em média de 9 a 21 dias e sua permanência além desse período significa que não houve a "pega" do transplante (TRIGG, 2004).

3. Sangue de cordão umbilical e placentário

Nos últimos anos a ciência vem encontrando diversas formas de utilizar as células-tronco como uma nova ferramenta na biotecnologia, como a sua utilização na terapia gênica e na medicina regenerativa, com o objetivo de contribuir para o tratamento e a busca da cura para diversas doenças.

O SCUP, como fonte de CTH, apresenta diversas vantagens sobre as outras fontes dessas células utilizadas terapêuticamente (MO e sangue periférico). Entre elas, o fato da coleta de células não ser um procedimento invasivo para o doador, além de esta ser uma fonte de células que oferece um menor risco de transmitir vírus, como citomegalo-

vírus, e da menor incidência de ocorrer doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Tem sido sugerido que o risco de desenvolver DECH em um paciente que recebe uma unidade de SCUP com até 2 alelos HLA (*Human Leukocyte Antigen* - antígeno leucocitário humano) incompatíveis é praticamente o mesmo de um paciente quando o transplante é realizado com a medula óssea de um doador HLA compatível (GLUCKMAN, KOEGLER e ROCHA, 2005).

O primeiro transplante utilizando SCUP foi realizado em 1988, em uma criança com anemia de Fanconi (GLUCKMAN *et al.*, 1989) e desde então tem aumentado o número de TCT utilizando-se esta fonte. As CTH são as células mais primitivas no sistema hematopoético e se originam no saco embrionário sendo transferidas para os demais órgãos através da circulação fetal (CLAPP *et al.*, 1989). Através de um processo de proliferação e comprometimento com a linhagem celular, as CTH originam os componentes do sistema hematopoético que incluem a unidade formadora de "explosão" eritróide (BFU, *burst forming unit*), a unidade formadora de colônia granulócito-macrófago (CFU-GM, *colony forming unit-granulocyte-macrophage*) a unidade formadora de colônia megacariócito (CFU-Mk, *colony forming unit-megakaryocyte*), entre outros (LEWIS, 2002). Aproximadamente de 30 a 45% do sangue do feto circula no cordão umbilical e na placenta, sendo ambos descartados após o parto havendo, assim, o desperdício de uma fonte rica em CTH e outras CT. A concentração dessas células no SCUP é, aproximadamente, dez vezes superior a do sangue periférico de um adulto normal. Essas células são consideradas imunologicamente imaturas, além de apresentarem um grande potencial proliferativo (TRIGG, 2004; PRANKE *et al.*, 2005.). O imunofenótipo caracterizado por CD34⁺CD38⁻ representa uma população de células primitivas e em pequena quantidade (0,05 -0,08% das células mononucleares totais) no SCUP (HAO *et al.*, 1995; MCGUCKIN *et al.*, 2003; PRANKE *et al.* 2002; RUBINSTEIN *et al.*, 2000). É importante salientar que as células CD34⁺CD38⁻ são consideradas as "verdadeiras" células-tronco hematopoéticas (ISHIKAWA *et al.*, 2003; PRANKE *et al.* 2001).

A contagem é o maior determinante capaz de afetar os resultados do transplante utilizando o SCUP (CHAO *et al.*, 2004; LEWIS, 2002). O número limitado de CTH e de células progenitoras que podem ser coletadas de uma única placenta representam o obstáculo mais importante para o sucesso do transplante de SCUP (WAGNER *et al.*, 2002). Nos critérios necessários para a coleta e seleção de doadores de SCUP deve-se considerar também a quantidade total de células nucleadas (AROVIIITA *et al.*, 2004; RUBINSTEIN *et al.*, 2000). Até pouco tempo, o número considerado necessário para o sucesso do transplante por alguns autores era de 2×10^6 de células CD34 por kg de peso corporal (MAVROUDIS *et al.*, 1996 apud RUBINSTEIN *et al.*, 2000; SANDHAUS *et al.*, 1998). Entretanto, estudos mais recentes têm mostrado que ao redor de 2×10^5 (GLUCKMAN *et al.*, 2005) ou $1,2 \times 10^5$ (LAUGHLIN *et al.*, 2001) células CD34 por quilograma de peso corporal são suficientes para que ocorra a "pega" do transplante.

A quantidade de CT transplantadas pode compensar parcialmente os efeitos da disparidade no sistema HLA (WAGNER *et al.*, 2002). As CTH do SCUP sofrem diferenças quanto a exposições microambientais comparadas à medula adulta ou sangue periférico. O fenótipo predominantemente imaturo de linfócitos T no SCUP pode contribuir para a reduzida aloreatividade observadas após o transplante (CAIRO *et al.*, 2005).

4. Células-tronco mesenquimais de sangue de cordão umbilical

A MO apresenta uma população em torno de 0,01 a 0,1% de células progenitoras ou CTM (PROCKOP, 1997). Tais células podem sofrer expansão *in vitro* e, sob condições específicas, originam tecido ósseo (CHEN *et al.*, 2001), tecido adiposo (ALLAN *et al.*, 2003), cardiomiócitos (ORLIC *et al.*, 2003), hepatócitos (SCWARTZ *et al.*, 2002) e células neurais (SONG *et al.*, 2004). Assim como as CTM da MO, as CTM do SCUP apresentam alta plasticidade, sendo consideradas multipotentes. Existem estudos que comprovam a diferenciação das CTM de SCUP em células neurais (HOU *et al.*, 2003), fibroblastos (KIM *et al.*, 2004; ROMANOV *et al.*, 2003), osteoblastos e adipócitos (LEE *et al.*, 2004), condrócitos (WANG *et al.*, 2004) cardiomiócitos (CHENG *et al.*, 2003) e hepatócitos (KANG *et al.*, 2006). Sabe-se que a partir do primeiro trimestre, o sangue fetal apresenta uma população de CTM. As CTM fetais não apresentam HLA classe II. Essas células também apresentam uma maior capacidade proliferativa do que as provenientes de tecidos adultos (O' DONOGHUE e FISK, 2004). Estudos de Campagnoli e colaboradores (2001) comparam as CTM do sangue fetal do primeiro, segundo e terceiro trimestres de gestação com as CTM da MO. Foram coletadas 34 amostras de sangue de fetos de 7 a 14 semanas de forma intratorácica utilizando ultra-som. A pesquisa foi realizada com gestantes que estavam clinicamente indicadas a interromper a gestação. As 7 amostras do segundo trimestre foram coletadas do SCUP com idade gestacional de 14 a 25 semanas de gestação. As amostras do terceiro trimestre foram de 38 a 40 semanas, consideradas a termo. Além disso, 4 amostras de MO de fetos (de 11 a 14 semanas) também foram coletadas para análise. Realizou-se cultivo de CTM das amostras de SCUP do segundo e terceiro trimestre. A frequência das células mononucleares foi superior nas culturas das amostras do segundo trimestre. Isso indicou que a frequência de CTM diminuiu com a idade gestacional. A análise imunofenotípica indicou que as células tanto fetais, como do SCUP e MO, apresentavam o mesmo perfil imunofenotípico: CD45⁺, CD34⁺, CD14⁺ e CD31⁺. As células do primeiro trimestre apresentaram o fenótipo CD44⁺, CD106⁺ e CD29⁺. Foi observado o potencial proliferativo das CTM do primeiro trimestre e da MO. As células, tanto fetais como da MO, foram capazes de diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos. Em estudo de Yu e colaboradores (2004) foram isoladas CTM do sangue fetal de 16 a 26 semanas (n=9) comparando-as com amostras de SCUP de NNT (n=10). As amostras de RN prematuros foram coletadas do cordão umbilical durante a gestação ou de forma intratorácica com um ultra-som em fetos abortados. Foi realizada a separação das células aderentes e imunofenotipagem das mesmas. A maior parte das células dos NNT não expressaram a proteína CD34, mas eram positivas para a molécula CD45 indicando sua derivação hematopoética. Algumas dessas células eram CD14⁺, mostrando o comprometimento com a linhagem monócito/macrófago, além de serem negativas para a molécula CD90, excluindo a possibilidade de origem mesenquimal. Apenas 2 das amostras de NNT, quando cultivadas, apresentaram formação de CFU-F (unidades formadoras de colônia de fibroblasto), ao passo que 8 das 9 amostras de RN prematuros apresentaram a formação das CFU-F. As células derivadas da CFU-F (CFU-FC) mostraram, como perfil imunofenotípico, CD14⁺, CD45⁺, CD34⁺, HLA-DR⁻, com altos níveis de expressão de CD44, CD90 e baixa expressão de CD71 e CD105. Foi observado um de-

créscimo do número de CFU-FC com o progresso da idade gestacional. Além disso, foi testada a capacidade de diferenciação das CFU-FC das amostras de prematuros em neurônios, osteócitos e adipócitos, obtendo-se um resultado satisfatório. O estudo concluiu que CTM residem principalmente no sangue fetal de menor tempo gestacional.

5. Marcadores celulares

Para diferenciar os tipos de CT existem os chamados marcadores celulares que são glicoproteínas localizadas na superfície celular e que podem se ligar a outras moléculas sinalizadoras (Tabela I). Através da combinação desses marcadores de superfície é possível determinar a linhagem e o grau de maturidade ou imaturidade celular. Dessa forma, pode-se reconhecer determinados progenitores celulares, utilizando-se técnicas capazes de identificar populações específicas de CT utilizando métodos de fluorescência (Fig.2) (GASPARONI *et al.*, 2000; KIRSCHSTEIN e SKIRBOLL, 2001; KRAUSE *et al.*, 1996 apud CAIRO *et al.*, 2005).

TABELA I
Principais marcadores celulares utilizados para identificação de células-tronco e suas caracterizações

Marcador celular	Tipo celular
CD34	CTH, progenitor endotelial
CD38	CTH, precursores hematopoéticos da linhagem linfóide
c-Kit	CTH, C TM
CD45	Marcador leucocitário
CXCR4 (CD 184)	Progenitor/CTH e CTM
CD33	Células-tronco neurais, identificação de neurônios e células da glia
Anti HLA- DR	Antígeno MHC II
CD44	CTM
Thy -1	CTH e CTM

Através da análise da presença ou ausência de determinados marcadores celulares é possível identificar as CTH e, portanto, determinar o número dessas células que é um fator fundamental para o sucesso do transplante (KIRSCHSTEIN e SKIRBOLL, 2001; WAGNER *et al.*, 2002). Os progenitores hematopoéticos usualmente expressam na superfície celular o antígeno CD34 e as CTH podem ser identificados pela presença de CD34 e ausência de CD38, bem como de outros antígenos comprometidos com as linhagens mielóide e linfóide (DARENA *et al.*, 1996). Porém, as CTM são positivas para CD13, CD28, CD33, CD44, CD105, CD166 e HLA I (KIM *et al.*, 2004).

6. Sangue de cordão umbilical de recém-nascidos prematuros

Estudos de Haneline e colaboradores (1994) e de Thilaganathan e colaboradores (1994) observaram uma diminuição do número de células CD34 com o avanço da idade gestacional existentes no SCUP. Foram analisadas no estudo amostras de SCUP de neonatos de 23 a 41 semanas e de 13 a 38 semanas respectivamente (GASPARONI, *et al.*, 2000; OPIE *et al.*, 1998).

Liang e colaboradores (1988) analisaram 45 amostras de SCUP de RN prematuros e 91 de NNT. O objetivo do estudo foi a observação das CFU-GM formadas em meio específico a partir da vigésima terceira semana de gestação até o nascimento dos neonatos. O número de colônias formadas a partir das amostras dos dois grupos não apresentou diferenças significativas.

Meister e colaboradores (1994) analisaram as células CD34⁺ de SCUP de RN prematuros (n=3) e NNT (n = 18) utilizando análise imunofenotípica. Não foi observada nenhuma diferença estatística na frequência das células CD34⁺ entre os RN prematuros e NNT. Além disso, não foi observada dife-

rença em relação à fração celular CD34⁺ comprometida com a linhagem mielóide e coexpressando CD33⁺. Entretanto, a fração celular CD34⁺ comprometida com a linhagem eritróide coexpressando CD71⁺ foi superior em RN prematuros, significando que a idade gestacional estava relacionada com o comprometimento da linhagem celular.

Migliaccio e colaboradores (1996) caracterizaram os progenitores celulares considerando seu potencial de auto-renovação e número de colônias formadas *in vitro* na presença de fatores de crescimento. A capacidade de auto-renovação foi observada através do número de células progenitoras primárias e secundárias formada pelas colônias. Foram analisadas amostras de RN prematuros de 17 a 32 semanas e de NNT de 36 semanas. Não foi observada diferença no número de progenitores celulares nas amostras analisadas e na formação de colônias.

Opie e colaboradores (1998) realizaram um estudo com o propósito de observar a frequência das células CD34⁺ coexpressando CD33 utilizando 10 RN prematuros e 12 NNT. Foi observado que a expressão de CD34 apresentava-se elevada nas amostras de RN de 17 a 24 semanas de gestação comparada com as amostras de 37 a 41 semanas. O número de células CD34⁺CD38⁺ foi superior em RN prematuros. A expressão de CD34⁺ CD33⁻ foi inferior nas amostras de RN prematuros, assim como antígenos Lin⁻. Os resultados são semelhantes aos estudos de Thilaganathan e colaboradores (1994) que observaram um aumento da expressão de CD34⁺ CD33⁻ com o aumento da idade gestacional. Porém, a expressão de CD34⁺ CD33⁺ e de CD34⁺ Lin⁺ foi superior em RN prematuros. Esse resultado foi explicado como uma necessidade do aumento do número de progenitores comprometidos com a linhagem eritróide devido à expansão do microambiente fetal. O número de CFU mostrou-se mais elevado nas amostras de RN prematuros. Shields e colaboradores (1998) analisaram a frequência de células CD34⁺ em amostras de sangue de 17 a 24 semanas de gestação e de 37 a 41 semanas de gestação. A análise foi realizada considerando-se a quantidade de CFU na presença de fatores de crescimento como a interleucina-3, interleucina-6, fator estimulante de CFU-GM, fator estimulante de célula-tronco (*stem cell factor*) e a eritropoetina, além da frequência de CFU-GM, BFU e CFU totais. Observou-se que a quantidade de células CD34⁺ em RN prematuros foi 4,9 vezes superior a dos NNT, diminuindo com a idade gestacional. O número de CFU totais, CFU-GM e BFU foi superior nos RN prematuros.

WYRSCH e colaboradores (1999), através de análise imunofenotípica observaram que o SCUP de 17 RN prematuros de 16 a 18 semanas de gestação, e de 17 RN prematuros de 29 a 34 semanas foi superior em progenitores hematopoéticos. A comparação foi realizada com 18 NNT. A frequência de células CD34⁺CD38⁺ mostrou-se elevada em RN prematuros. A quantidade de células CD34⁺ observada foi superior durante o segundo trimestre da gestação e diminuiu com o progresso da gestação.

Em um outro estudo, Gasparoni e colaboradores (2000) realizaram uma análise de SCUP de 11 fetos de 19 a 24 semanas provenientes de aborto espontâneo e de 12 RN de 25 a 28 semanas. Foi feita uma comparação com 10 NNT. Dos RN prematuros, 9 nasceram através de cesariana e 3 de parto normal. Todos os NNT foram de cesariana. Foi observado que o número de células CD34⁺ apresentava-se superior nos 11 fetos provenientes de aborto espontâneo. Além disso, com o aumento da idade gestacional observou-se um declínio do número de células CD34⁺, independentemente

do tipo de parto. O número de células CD34⁺CD38⁺ e CD34⁺CD45⁺ foi superior em NNT. As amostras de SCUP de NNT apresentaram células coexpressando marcadores CD19, CD38, CD33 e CD45, o que demonstrou ser um comprometimento com os progenitores hematopoéticos.

Surbek e colaboradores (2000) realizaram um estudo com a finalidade de investigar a quantidade de células nucleadas e quantidade de células CD34⁺ em amostras de SCUP de RN prematuros. As 45 amostras coletadas foram de RN de 22 a 36 semanas sendo 61% das amostras provenientes de parto normal e 39% de cesariana. Foi encontrada uma correlação positiva entre a idade gestacional e o número de células nucleadas por amostra. Entretanto, o número de células CD34⁺ permaneceu constante nas amostras. Além disso, calculou-se a proporção de células mononucleares e células CD34⁺ das amostras de RN prematuros, relacionando-as com o número de células sugerido pelo Eurocord (1x 10⁷ células nucleadas totais e 1x10⁶ células CD34⁺/Kg). Dessa forma, 77 % das amostras, considerando-se as células nucleadas, ou 42% das amostras, considerando as células CD34⁺, poderiam ter sido utilizadas em transplantes para um doador com mais de 20 Kg de peso corporal.

Campagnoli e colaboradores (2000) investigaram os progenitores celulares de 109 amostras de 7 a 40 semanas de gestação. As 64 amostras do primeiro trimestre foram coletadas durante a cirurgia para interrupção da gravidez com a ajuda de ultra-som. Progenitores hematopoéticos e não-hematopoéticos foram encontrados em todas as idades gestacionais. Após cultura das células CD34⁺ do primeiro trimestre, o progenitor predominante foi do tipo CFU-GEMM. No segundo trimestre houve um aumento dos progenitores BFU-e CFU-GM. Já no terceiro trimestre predominou o progenitor tipo BFU-e. Um grande número de progenitores do primeiro trimestre proliferou *in vitro* em resposta a diferentes citocinas. A frequência das células CD34⁺ nas amostras do primeiro trimestre foi similar a dos NNT. Entretanto, a porcentagem das células CD34⁺CD38⁺ apresentou-se superior nas amostras do primeiro trimestre. Também nesse estudo constatou-se um decréscimo no número de progenitores com o progresso da idade gestacional. O estudo comprovou a possibilidade de isolar progenitores multipotentes da circulação fetal do primeiro trimestre de gestação.

Aroviita e colaboradores (2005) observaram a relação do número de células CD34⁺ em SCUP com o peso do RN, sexo e tipo de parto. A análise foi realizada com RN com mais de 33 semanas. Foram coletadas 1040 amostras de RN do sexo masculino e 940 do sexo feminino. Além disso, o peso do RN foi observado para posterior comparação. Nenhuma diferença estatística foi observada em relação ao tipo de parto e peso do RN. Já o sexo masculino influenciou na concentração de células CD34⁺. As amostras do sexo masculino apresentaram uma diferença de 5,3 % no número de células CD34⁺ comparadas com as amostras do sexo feminino.

Cervera e colaboradores (2006), no entanto, avaliaram as células progenitoras e hematopoéticas em 43 amostras de SCUP de RN prematuros e em 40 amostras de SCUP de NNT. Não se encontrou nenhuma diferença significativa na quantidade de células mononucleares ou na concentração de CD34 x 10⁶/L nas amostras de RN prematuros e NNT. Já a porcentagem de progenitores primitivos linfóides como CD34⁺CD7⁺, CD34⁺CD7⁺CD19⁺CD117⁺ e células primitivas progenitoras e hematopoéticas CD34⁺CD38⁻ foi superior em RN prematuros.

DISCUSSÃO

Apesar de transplantes utilizando células-tronco serem cada vez mais frequentes, há poucos estudos relatando a caracterização das mesmas no SCUP de RN prematuramente. No entanto, alguns estudos mostram-se conclusivos quanto à capacidade proliferativa das CT em SCUP de crianças prematuras. O estudo comparativo das CT no SCUP de neonatos prematuros é importante para o melhor entendimento da biologia das CT. Porém, provavelmente, essas amostras não serão utilizadas nos transplantes, uma vez que, geralmente, a prematuridade está associada a alguma anormalidade do feto, o que impossibilitaria o uso da amostra de SCUP em tratamentos.

Durante a embriogênese humana, a hematopoese inicia no saco embrionário (WYRSCH *et al.*, 1999). O número de progenitores fetais na circulação muda durante a gestação devido a mudanças nos órgãos onde acontece a hematopoese. De fato, aproximadamente entre a 5ª e a 12ª semana de gestação, a hematopoese passa a ocorrer no fígado fetal e baço, onde permanece como o principal órgão de produção de células sanguíneas durante a gravidez (GASPARONI *et al.*, 2000; PÉAULT, 1996; TAVASSOLI, 1991). Posteriormente, a MO torna-se o local da hematopoese (CAMPAGNOLI *et al.*, 2000). O grande número de células CD34 coexpressando marcadores de linhagem comprometida em NNT determina uma maturação dos progenitores hematopoéticos com o avanço da idade gestacional o que é observado em alguns estudos (GASPARONI *et al.*, 2000; WYRSCH *et al.*, 1999). Os resultados dos estudos de Thilaganathan e colaboradores (1994) e Campagnoli (2000) sugerem que as células CD34⁺ circulantes contribuem para a hematopoese fetal. Embora o SCUP de NNT apresenta uma menor frequência de células CD34⁺, o SCUP apresenta um maior número de progenitores hematopoéticos imaturos (caracterizados pela ausência das moléculas CD33 e CD38) quando comparado com MO (OPIE *et al.*, 1998). Sendo assim, o SCUP mostra-se como uma fonte importante de CT. Deve-se considerar o SCUP de RN prematuros um alvo importante a ser estudado para o melhor entendimento do funcionamento das CT. No entanto, se por um lado a imaturidade das células garante menor aloreatividade e aumenta as chances de sucesso do transplante, deve-se considerar que o nascimento prematuro por diversas vezes ocorre devido à má formação do feto, doenças genéticas ou outros males que acometem a gestante. Nesses casos não há como haver um aproveitamento do SCUP.

Embora as pesquisas tenham avançado no que diz respeito às CT tanto do SCUP quanto da MO, poucos estudos envolvem RN prematuros. Mas já foi observado que a idade gestacional também influencia na frequência das células. Provavelmente a mudança da hematopoese do fígado fetal para a MO com o progresso do desenvolvimento fetal seja o responsável por esse fato (CAMPAGNOLI *et al.*, 2001). A migração das CT para a MO com o aumento da idade gestacional também explica porque as CFU-F são escassas em NNT e sangue periférico. Além disso, é possível que macrófagos e linfócitos no decorrer do seu desenvolvimento possam inibir o crescimento das CFU-F (YU *et al.*, 2004).

CONCLUSÕES

A importância terapêutica das CT vem sendo comprovada a cada dia com novas descobertas no tratamento de diversas doenças. O SCUP mostra ser uma importante fonte destas células com um incrível potencial terapêutico, além de

apresentar uma relevante segurança para o transplantado e para o doador. Apesar das inúmeras pesquisas utilizando SCUP, o número de estudos envolvendo neonatos prematuros ainda é restrito, embora vários estudos já tenham comprovado a diminuição da frequência da linhagem mais imatura com o avanço da idade gestacional. Esse fato tem importante influência no sucesso do transplante. A maioria dos autores afirmou que o SCUP de prematuros deve ser considerado como alvo de novas pesquisas e não deve ser descartado. Assim, um maior número de estudos são necessários relacionando-se diversos fatores, principalmente fisiológicos e imunofenotípicos, para que se possa evidenciar diferenças que possam influenciar no resultado em transplantes e servir como método de seleção no armazenamento em bancos de sangue de cordão umbilical. Comprovou-se o potencial de diferenciação da CTM do SCUP e a sua possível utilização terapêutica no tratamento de doenças como o mal de Parkinson, doenças imunológicas e cardíacas. São poucos os estudos na literatura observando as CTM em sangue fetal. Apesar disso, as análises existentes afirmam que essas CTM também apresentam uma grande capacidade de proliferação e diferenciação. Portanto, não devem ser descartadas as possibilidades de novas pesquisas com essas células.

REFERÊNCIAS

1. ALLAN, E. H.; HO, P. W.; UMEZAWA, A.; HATA, J.; MAKISHIMA, F.; GILLESPIE, M. T.; et al. Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line. *J. Cell. Biochem.*, v. 1, p. 158-169, 2003.
2. AROVIITA, P.; TERAMO, K.; HIILESMAA, V.; KEKOMAKI, R. Cord blood hematopoietic progenitor cell concentration and infant sex. *Transfusion*, v. 45, p. 613-621, 2005.
3. AROVIITA, P.; TERAMO, K.; HIILESMAA, V.; WESTMAN, P.; KEKOMAKI, R. Birthweight of full-term infants is associated with cord blood CD34⁺ cell concentration. *Acta Paediatr.*, v. 93, n. 10, p. 1323-1329, 2004.
4. CAIRO, M. S.; WAGNER, E. L.; FRASER, J.; COHEN, G.; van de VEN, C.; CARTER, S. L.; KERNAN, N. A.; KURTZBERG, J. Characterization of banked umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells and lymphocyte subsets and correlation with ethnicity, birth weight, sex, and type of delivery: a Cord Blood Transplantation (COBLT) Study report. *Transfusion*, v. 45, p. 856-866, 2005.
5. CAMPAGNOLI, C.; FISK, N.; OVERTON, T.; BENNET, P.; WATTS, T.; ROBERTS, I. Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood. *Blood*, v. 95, n. 6, p. 967-1972, 2000.
6. CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, I. A. G.; KUMAR, S.; BENNET, P. R.; BELLANTUONO, I. FISK, M. N. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood*, v. 98, n. 8, p. 2396-2402, 2001.
7. CERVERA, A.; LILLO, R.; GARCÍA-SÁNCHEZ, F.; MADERO, L.; MADERO, R.; VICARIO, J.L. Flow cytometric assessment of hematopoietic cell subsets in cryopreserved preterm and term cord blood, influence of obstetrical parameters, and availability for transplantation. *Am. J. Hematol.*, v. 81, n. 6, p. 397-410, 2006.
8. CLAPP, D.W.; BAILEY, E.; GERSON, S. L. Gestational age-dependent changes in circulating hematopoietic stem cells in newborn infants. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 113, n. 4, p. 422-427, 1989.
9. CHAO, N. J.; EMERSON, S. G.; WEINBERG, K. I. Stem Cell Transplantation (Cord Blood Transplants). *Hematology*, p. 354-371, 2004.
10. CHEN, T. L.; SHEN, W. J.; KRAEMER, F. B. Human BMP-7/OP-1 induces the growth and differentiation of adipocytes and osteoblasts in bone marrow stromal cell cultures. *J. Cell. Biochem.*, v. 2, p. 187-199, 2001.
11. CHENG, F.; ZOU, P.; YANG, H.; YU, Z.; ZHONG, Z. Induced differentiation of human cord blood mesenchymal stem/progenitor cells into cardiomyocytes-like cells in vitro. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.*, v. 32, n. 2, p. 154-157, 2003.
12. D'ARENA, G.; MUSTO, P.; CASCAVILLA, N.; DI GIORGIO, G.; ZENDOLI, F.; CAROTENUTO, M. Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Haematologica*, v. 81, p. 404-409, 1996.
13. GANG, E. J.; HONG, S. H.; JEONG, J. A.; HWANG, S. H.; KIM, S. W.; YANG, I. H.; HAN, H.; KIM, H. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys. Res. Commu.*, v.

- 13, n. 321, p. 102-108, 2004.
14. GASPARONI, A.; CIARDELLI, L.; AVANZINI, M. A.; BONFICHI, M.; di MARIO, M.; MARTINOTTI, L.; VANELLI, L.; RONDINI, R.; CHIRICO, G. Immunophenotypic changes of fetal cord blood hematopoietic progenitor cells during gestation. *Pediatr. Res.*, v. 47, n. 6, p. 825-829, 2000.
 15. GLUCKMAN, E.; KOEGLER, G.; ROCHA, V. Human leukocyte antigen matching in cord blood transplantation. *Semin. Hematol.*, v. 42, p. 85-89, 2005.
 16. GLUCKMANN, E.; BROXMEYER, H. A.; AUERBACH, A.D.; FRIEDMAN, H. S.; DOUGLAS, G.W.; DEVERGIE, A. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA- identical sibling. *N. Engl. J. Med.*, v. 321, p. 1174-1178, 1989.
 17. HANELINE, L. S.; MARSHALL, K. P.; CLAPP, D. W. The highest concentration of primitive hematopoietic progenitor cells in cord blood is found in extremely premature infants. *Pediatr Res.* v. 39, n. 5, p. 820-825, 1996.
 18. HAO, Q.; SHAH, A. J.; THIEMANN, F. T.; SMOGORZEWSKA, E. M.; CROOKS, G. M. A Functional Comparison of CD34+CD38- Cells in Cord Blood and Bone Marrow. *Blood*, v. 86, n. 10, p. 3745-3753, 1995.
 19. HOU, L.; CAO, H.; WANG, D.; WEI, G.; BAI, C.; ZHANG, Y.; PEI, X. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *Int. J. Hematol.*, v. 78, n. 3, 2003.
 20. ISHIKAWA, F.; LIVINGSTON, A. G.; MINAMIGUCHI, H.; WINGARD, J. R.; OGAWA, M. Human cord blood long-term engrafting cells are CD34+CD38- . *Leukemia*, v. 17, p. 960-964, 2003.
 21. KANG, X. Q.; ZANG, W. J.; BAO, L. J.; LI, D.L.; XU, X. L.; YU, X. J. Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol. Int.* v. XX, p.1-7, 2006.
 22. KIM, J. W.; KIM, S. Y.; PARK, S. Y.; KIM, Y. M.; KIM, J. M.; LEE, M. H.; RYU, H. M. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Ann. Hematol.*, v. 83, p. 733-738, 2004.
 23. KIRSCHSTEIN, R.; SKIRBOLL, L. R. Stem cells: scientific progress and future research directions. National Institutes of Health, 2001 Disponível em: <<http://stemcells.nih.gov/info/scireport>>. Acesso em: 22 mar. 2006.
 24. KRAUSE, D. S.; FACKLER, M. J.; CIVIN, C. I.; MAY, W. S. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, v. 87, p. 1-13, 1996.
 25. LAUGHLIN, M. J.; BARKER, J.; BAMBACH, B.; KOC, O. N.; RIZZIERI, D.A.; WAGNER, J. E.; GERSON, S. L.; LAZARUS, H. M.; CAIRO, M.; STEVENS, C. E.; RUBINSTEIN, P.; KURTZBERG, J. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *The New England Journal of Medicine*, v. 344, p. 1815-1822, 2001
 26. LEE, O. K.; CHEN, W. M.; LEE, K. D.; HSIEH, S. L.; CHEN, T. H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, v. 103, p. 1669-1675, 2004.
 27. LEWIS, I. D. Clinical and experimental uses of umbilical cord blood. *Intern. Med. J.*, v. 32, p. 601-609, 2002.
 28. LI, K.; LIU, J.; FOK, T. F.; YAU, F. W.; WONG, A.; LI, C. K.; YANG, M.; SO, K. W.; CHIK, K. W.; TSANG, K. S.; SHING, M. M.; YUEN, P. M. Human neonatal blood: stem cell content, kinetics of CD34+ cell decline and ex vivo expansion capacity. *Br. J. Haematol.*, v. 140, n. 1, p. 175-185, 1999.
 29. LIANG, D. C.; MA, S.W.; LIN-CHU, M.; LAN, C. C. Granulocyte/macrophage colony-forming units from cord blood of premature and full-term neonates: its role in ontogeny of human hemopoiesis. *Pediatr. Res.*, v. 24, n. 6, p. 701-702, 1988.
 30. MAVROUDIS, D.; READ, E.; COTTLER-FOX, M.; et al. CD34+ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood*, v. 88, p. 3223-3229, 1996.
 31. MCGUCKIN, C. P.; PEARCE, D.; FORRAZ, N.; TOOZE, J.A.; WATT, S. M.; PETTENGELL, R. Multiparametric analysis of immature cell populations in umbilical cord blood and bone marrow. *Eur. J. Haematol.*, v. 71, n. 5, p. 341-350, 2003.
 32. MEISTER, B.; TOTSCH, M.; MAYR, A.; WIDSCHWENDTER, M.; HUTER, O.; SPERL, W. Identification of CD34+ cord blood cells and their subpopulations in preterm and term neonates using three-color flow cytometry. *Biol neonate*, v. 66, n. 5, p. 272-79, 1994.
 33. MIGLIACCIO, G.; BAIOCCHI, M.; HAMEL, N.; EDDLEMAN, K.; MIGLIACCIO, A. R. Circulating progenitor cells in human ontogenesis: response to growth factors and replating potential. *J. Hematother.*, v. 5, n. 2, p. 161-170, 1996.
 34. O' DONOGHUE, K. O.; FISK, N. M. Fetal stem cell. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, v. 18, n. 6, p. 853-87, 2004.
 35. OPIE, T. M.; LAURENCE, E. SHIELDS, ANDREWS, R.G. Cell- surface antigen expression in early and term gestation fetal hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*, v. 16, p. 343-348, 1998.
 36. ORLIC, D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci*, v. 996, p. 152-157, 2003.
 37. PÉAULT, B. Hematopoietic stem cell emergence in embryonic life: developmental hematology revisited . *J. Hematother.*, v. 5, p. 369-378, 1996.
 38. PRANKE, P.; FAILACE, R. R.; ALLEBRANDT, W. F.; STEIBEL, G.; CHIMIDT, F.; NARDI, N.B. Hematologic and immunophenotypic characterization of human umbilical cord blood. *Acta Haematol.* v. 105, p. 71-76, 2001.
 39. PRANKE, P.; HENDRIKX J.; DENATH, G.; ALESPEITI, G.; NARDI, N.; RUBINSTEIN, P. & VISSER, J. W. M. Immunophenotype hematopoietic stem cells from placental/ umbilical cord blood after culture. *Braz J Med Biol Res*, v.38, p. 1775-1789, 2005.
 40. PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, v. 276, p. 71-74, 1997.
 41. ROMANOV, Y. A.; SVINTSITSKAYA, V. A.; SMIRNOV, V. N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, v. 21, p. 105-110, 2003.
 42. RUBINSTEIN, P.; MIGLIACCIO, A. R.; ADAMSON, J. W.; STEVENS, C. E.; DOBRILA, N. L.; CARRIER, C. M.; Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood*, v. 96, n. 8, p. 2717-2722, 2000.
 43. SANDHAUS, L. M.; EDINGER, M. G.; TUBBS, R. R.; GOORMASTIC, M.; BAUCCO, P. A.; SERAFINO, S. E.; BOLWELL, B. A simplified method of CD34+ cell determination for peripheral blood progenitor cell transplantation and correlation with clinical engraftment. *Exp. Hematol.*, v. 26, p. 73-78, 1998.
 44. SCHWARTZ, R. E.; REYES, M.; KOODIE, L. et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*, v.109, p. 1291-1302, 2002.
 45. SCHWARTZ, R. E.; REYES, M.; KOODIE, L.; JIANG, Y.; BLACKSTAD, M.; LUND, T. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.*, v. 10, p. 1291-1302, 2002.
 46. SHIELDS, L.E.; ANDREWS, R.G. Gestational age changes in circulating CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells in fetal cord blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 178, n. 5, p. 931-937, 1998.
 47. SONG, S.; KAMATH, S.; MOSQUERA, D.; ZIGOVA, T.; SANBERG, P.; VESELY, D. L., et al. Expression of brain natriuretic peptide by human bone marrow stromal cells, *Exp Neurol*, v. 1, p. 191-197, 2004.
 48. SURBEK, D.V.; HOLSGREVE, W.; STEINMANN, C.; HAHN, S.; GRATWOHL, A.; WODNAR-FILIPOWICZ, A.; TICHELLI, A. Preterm birth and the availability of cord blood for HPC transplantation. *Transplantation*, v. 40, p. 817-20, 2000.
 49. TAVASSOLI, M. Embryonic and fetal hematopoiesis: An overview. *Blood Cells*, v. 17, p. 269-281, 1991.
 50. THILAGANATHAN, B.; NICOLAIDES, K. H.; MORGAN G. Subpopulations of CD34- positive haematopoietic progenitors in fetal blood. *Br. J. Haematol.*, v. 87, p. 634-636, 1994.
 51. THOMAS, E. D. Bone marrow transplantation: a review. *Semin. Hematol.*, v. 36, p. 95-103, 1999.
 52. TRIGG, M. E.; Hematopoietic Stem cells. *Pediatrics*, v. 113, n. 4, p. 1051-1057, 2004.
 53. WAGNER, J. E.; BARKER, J. N.; DEFORK, T. E.; BAKER, K. S.; BLAZAR, B. R.; EIDE, C.; et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*, v. 100, p. 1611-1618, 2002.
 54. WANG, J. F.; WANG, L. J.; WU, Y. F.; XIANG, Y.; XIE, C. G.; JIA, B. B.; HARRINGTON, J.; MCNIECE, I. K. Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34+hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. *Haematologica*, v. 89, n. 7, p. 837-844, 2004.
 55. WYRSCH, A.; dalle CARBONARE, V.; JANSEN, W.; CHKLOVSKAIA, E.; NISSEN, C.; SURBEK, D.; HOLSGREVE, W.; TICHELLI, A.; WODNAR-FILIPOWICZ, A. Umbilical cord blood from preterm human fetuses is rich in committed and primitive hematopoietic progenitors with high proliferative and self-renewal capacity. *Exp. Hematol.*, v. 27, n. 8, p. 1338-1345, 1999.
 56. YU, M.; XIAO, Z.; SHEN, LI.; LI, L. Mid-trimester fetal blood-derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does not. *Br. J. Haematol.*, v. 124, 666-675, 2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dra. Thaís L. Gomes
Rua Felipe Camarão, 485/404, Bonfim
CEP. 90035-141 Porto Alegre - RS

Prevalência de Infecções Nosocomiais Provocadas por *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (M.R.S.A.), no Hospital Universitário Regional de Maringá*

Prevalence of Nosocomial Infections Provoked by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (M.R.S.A.), in the Regional University Hospital of Maringá

Louremi Bianchi Gualda de Souza¹ & Beatriz de Barros Figueiredo²

RESUMO - O padrão de infecção hospitalar tem mudado com os anos, refletindo os avanços da medicina e a contínua procura por antibióticos mais eficazes. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a prevalência de infecções nosocomiais provocadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (M.R.S.A.), no Hospital Universitário Regional de Maringá, Paraná. Os dados foram coletados através de levantamento e estudo retrospectivo na base de dados da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, sendo organizados e analisados com conteúdo obtido em literatura científica, propiciando subsídios para atualização e/ou melhoramento dos protocolos de controle de infecções hospitalares. Do total de 68 casos de infecção nosocomial por M.R.S.A., verificou-se que de 16,2% dessas infecções ocorridas no ano de 2003, houve um incremento para 60,2% no ano de 2005. Analisando informações de pacientes de todas as idades, constatou-se alta incidência de infecções em pacientes de 61 anos ou mais (32,4%), na unidade de terapia intensiva (83,1%) e maior ocorrência de tais infecções por M.R.S.A. associado ao uso de dispositivos médicos invasivos (ponta de cateter 39,2% e secreção orotraqueal 34,2%). É fundamental que os profissionais de saúde estejam atentos aos problemas de infecções nosocomiais e tomem medidas preventivas para reduzir o número de infecções hospitalares.

PALAVRAS-CHAVE - *Staphylococcus aureus*, infecções nosocomiais, meticilina

SUMMARY - The standard of hospital infection it has modified with the years reflecting the advances of the medicine and the continuous search for more efficient antibiotics. The objective of this work was to characterize the prevalence of nosocomial infections provoked by resistant *Staphylococcus aureus* the methicilin (M.R.S.A.), in the Regional University Hospital of Maringá, Paraná. The data had been collected through survey and retrospective, study in the database of the Commission of Control of Hospital Infection, being organized and analyzed with content gotten in scientific literature, propitiating subsidies for update and improvement of the protocols control of hospital infections. The total of 68 cases of nosocomial infection for resistant *Staphylococcus aureus* the methicilin, it was verified that of 16,2% of these occurred infections in the year of 2003, it occurred a increment for 60,2% in the year of 2005. Analyzing information of patients of all the ages, it was contacted, one evidenced high incidence of infections in patients of 61 years was evidenced (32,4%), in the intensive care unit (83,1%) and major occurrence of such infections for M.R.S.A. associated with the use of invasive medical devices (catheter tip 39,2% and tracheal secretion 34,2%). It is basic that the health professionals are intent to the problems of nosocomial infections and take writ prevention to reduce the number of hospital infections.

KEYWORDS - *Staphylococcus aureus*, nosocomial infections, methicilin

INTRODUÇÃO

O Ministério da Saúde, em conjunto com outros órgãos oficiais internacionais, define infecção hospitalar como aquela adquirida após a admissão do paciente e cuja manifestação ocorreu durante a internação ou após a alta, podendo ser relacionada com a internação ou a procedimentos hospitalares^{8, 15}.

As doenças infecciosas podem ser divididas em duas categorias: aquelas adquiridas no interior do hospital, como também em outras dependências médicas, denominadas infecções nosocomiais e, por segundo, aquelas adquiridas fora das dependências hospitalares, chamadas infecções adquiridas na comunidade podendo o paciente ter um ou outro tipo de infecção².

Conforme os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), as infecções adquiridas na comunidade são aquelas presentes ou incubadas no momento da admissão hospitalar, porém, todas as outras infecções associadas a hospitais são consideradas nosocomiais, inclusive as que surgem no período de 14 dias após a alta hospitalar².

No Brasil e no mundo, a infecção hospitalar é considerada um problema grave, crescendo tanto em incidência quanto em complexidade, gerando diversas implicações sociais e

econômicas¹⁵. De aproximadamente 40 milhões de hospitalizações por ano nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se que dois milhões de pacientes (cerca de 5 % do total) adquirem infecções nosocomiais, sendo que em 1995, aproximadamente 88 mil mortes foram relacionadas com infecções hospitalares, e totalizaram em um custo de 4,5 bilhões de dólares².

O advento tecnológico (utilização de procedimentos médicos invasivos como cateterização, novas técnicas cirúrgicas e diagnósticas, uso de terapia antimicrobiana de amplo espectro, a fim de facilitar o diagnóstico e tratamento do paciente hospitalizado) trouxe benefícios imensuráveis aos pacientes, mas, por outro lado, está sendo uma das causas do aumento na incidência de infecções por microrganismos multirresistentes^{2, 12, 16}.

Cerca de 70% dos isolados de *Staphylococcus aureus* de infecções nosocomiais, nos principais hospitais brasileiros, são resistentes a meticilina, conhecido como M.R.S.A.^{2, 5, 18}. Sua importância se dá pelo fato de apresentar resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos) e freqüentemente a diversas outras classes de antimicrobianos, restringindo muito as opções terapêuticas para o paciente²¹.

Staphylococcus aureus é uma importante causa de in-

Recebido em 25/09/2006

Aprovado em 02/01/2007

¹Docente do Centro de Ensino Superior de Maringá (CESUMAR), Mestrado em Tecnologia de Alimentos – Universidade Estadual de Londrina (UEL)

²Farmacêutica pela Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Acadêmica de Pós graduação em Análises Clínicas no

Centro de Ensino Superior de Maringá– CESUMAR

*Hospital Universitário Regional de Maringá, Paraná, Brasil

fecções associadas nos cuidados com a saúde, e acomete doenças desde a pele suave à doenças sistêmicas potencialmente fatais como endocardite e a síndrome do choque tóxico. É um patógeno comum que afeta indivíduos de todas as idades, principalmente os mais jovens e os idosos³. As infecções causadas por M.R.S.A. foram adquiridas quase que exclusivamente em hospitais, pela permanência de períodos longos, colonização ou infecção por exposição prévia a antibióticos dentro do hospital, admissão a uma unidade de tratamento intensivo, cirurgias, entre outras⁴. A prevalência desse microrganismo resistente em infecções adquiridas em hospitais é maior que adquiridas na comunidade, visto que a maioria das infecções comunitárias por *Staphylococcus aureus* é sensível a metilina¹⁰.

O principal reservatório de *Staphylococcus aureus* é o Homem, podendo estar presente na microbiota natural das fossas nasais, apontada, então, como uma importante via de disseminação do microrganismo, através dos profissionais da saúde no ambiente hospitalar¹⁸.

É de extrema importância levantamentos sobre a prevalência de infecções nosocomiais, podendo assim avaliar a eficácia das medidas de controle, observando a incidência de casos, obtendo maior conhecimento sobre esses patógenos oportunistas, contribuindo para a implementação e/ou atualização de protocolos que possibilitem minimizar os riscos de infecções hospitalares, melhorando a qualidade da assistência prestada ao paciente hospitalizado.

O objetivo do trabalho foi caracterizar a prevalência de infecções nosocomiais provocadas por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (M.R.S.A.), no Hospital Universitário Regional de Maringá, Paraná. Foi, então, analisado o período de fevereiro de 2003 a janeiro de 2006, com base nos dados da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, propiciando maiores subsídios para atualização ou melhoramento de protocolos de controle de infecções hospitalares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Após aprovação pelo Comitê de Ética do Centro Superior de Maringá e o parecer da Educação Continuada do Hospital Universitário Regional de Maringá, Paraná, Brasil, os dados foram coletados por meio de levantamento e estudo retrospectivo na base de dados da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH).

Para a coleta de dados utilizou-se um formulário, o qual continha elementos necessários para elaboração da incidência de infecção hospitalar por M.R.S.A., com requisito de alguns dados: período de hospitalização, idade do paciente, unidade hospitalar em que o paciente se encontrava, e o material coletado para análise.

Os resultados foram analisados de forma descritiva e matemático-estatística, usando frequência absoluta e porcentagem⁷.

RESULTADOS

Foi analisado o período de fevereiro de 2003 a janeiro de 2006, de acordo com informações obtidas nos formulários, gerando um total de 68 casos de infecção hospitalar por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina.

Do total de 68 casos de infecções nosocomiais comprovou-se que de 16,2% infecções por M.R.S.A. ocorridas no ano de 2003, houve um incremento para 60,2% no ano de 2005. Constatou-se que o período de internação dos 68 pacientes (100%) foi de no mínimo sete dias, e que 62,3% das infecções de M.R.S.A. estavam associadas com outras infecções.

TABELA I

Distribuição de pacientes que se constatou infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, no Hospital Universitário, segundo faixa etária

Período	02/2003 a 01/2004	02/2004 a 01/2005	02/2005 a 01/2006	Total (n° / %)
Idade (anos)				
0 – 10	1	2	4	7 / 10,3
11 – 20	1	0	2	3 / 4,4
21 – 30	0	0	6	6 / 8,8
31 – 40	0	4	4	8 / 11,8
41 – 50	3	0	7	10 / 14,7
51 – 60	0	3	9	12 / 17,6
61 ou mais	6	7	9	22 / 32,4
Total	11	16	41	68 / 100

Na tabela 1 estão distribuídos os casos de infecções por M.R.S.A. por faixa etária, ocorrendo mais frequentemente nas faixas etárias de 41 a 50 anos (14,7%), de 51 a 60 anos (17,6%) e de 61 anos ou mais (32,4%).

Na figura 1 pode ser constatado o aumento das infecções hospitalares por M.R.S.A. em todas as faixas etárias de pacientes no decorrer dos anos (2003-2006).

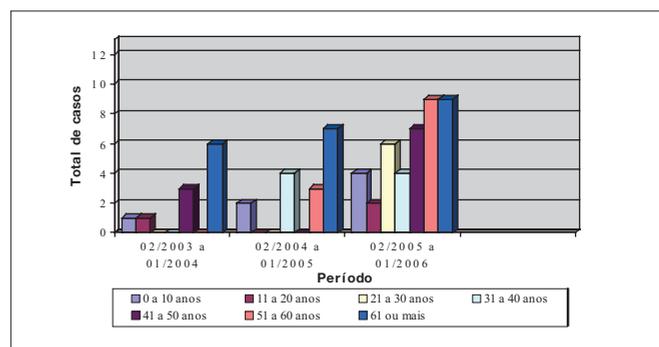


Figura 1- Distribuição de pacientes que constatou-se infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, no Hospital Universitário, segundo faixa etária, no período de fevereiro de 2003 a janeiro de 2006

De acordo com a unidade hospitalar em que o paciente permaneceu, houve prevalência de infecções em pacientes que estiveram na unidade de terapia intensiva (83,1%) em relação à unidade de clínica cirúrgica (16,9%). Esses dados estão dispostos na tabela 2.

TABELA II

Distribuição de pacientes que constatou-se infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, no Hospital Universitário, conforme a unidade hospitalar

Período	02/2003 a 01/2004	02/2004 a 01/2005	02/2005 a 01/2006	Total (n° / %)
Unidade Hospitalar				
Unidade de Terapia Intensiva	9	14	36	59 / 83,1
Clínica Cirúrgica	3	4	5	12 / 16,9
Total	12	18	41	71 / 100

A figura 2 possibilita analisar que as infecções nosocomiais por M.R.S.A. aumentaram notavelmente nas unidades de terapia intensiva, visto que é um setor hospitalar restrito aos profissionais e também a poucos visitantes, devidamente paramentados.

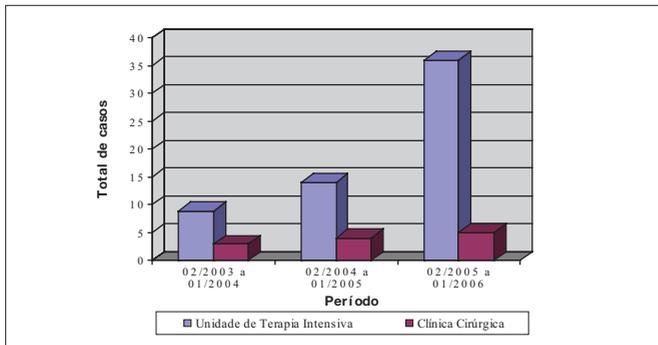


Figura 2- Distribuição de pacientes que constatou-se infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, no Hospital Universitário, conforme a unidade hospitalar, no período de fevereiro de 2003 a janeiro de 2006

Para a confirmação de resistência das cepas bacterianas avaliadas neste trabalho, o laboratório responsável pela sua realização utilizou critérios estabelecidos pelo *Clinical And Laboratory Standards Institute* (CLSI), organização internacional que promove o desenvolvimento e a utilização das normas e procedimentos laboratoriais padronizados. Observou-se que dentre os materiais biológicos analisados há prevalência de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina em pontas de cateter (39,2%) e em secreções orotraqueais (34,2%), que podem ser constatados na figura 3. Esses dados estão dispostos na tabela 3.

TABELA III

Distribuição de pacientes que se constatou infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, no Hospital Universitário, conforme o tipo de material coletado para análise

Período	02/2003 a 01/2004	02/2004 a 01/2005	02/2005 a 01/2006	Total (n ° / %)
Materia l coletado				
Biópsia	0	0	1	1 / 1,3
Ponta de cateter	3	9	19	31 / 39,2
Sang ue	1	2	8	11 / 13,9
Secre ção de abcesso	1	0	3	4 / 5,0
Secre ção ocular	1	0	0	1 / 1,3
Secre ção orotraqueal	4	6	17	27 / 34,2
Swab nasal	0	1	0	1 / 1,3
Urina / Líquido pleural	1	0	2	3 / 3,8
Total	11	18	50	79 / 100

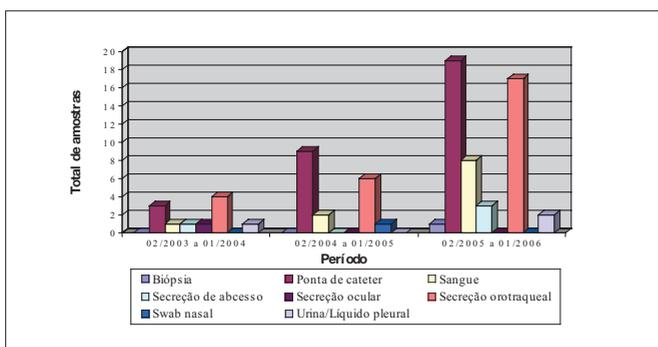


Figura 3- Distribuição de pacientes que constatou-se infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, no Hospital Universitário, conforme o tipo de material coletado para exame, no período de fevereiro de 2003 a janeiro de 2006

A prevalência de infecções nosocomiais em pacientes acima de 61 anos, constatado neste trabalho, coincide com resultados de outros trabalhos^{16,17}; a compreensão se dá pelo fato de que os idosos costumam ser pacientes clinicamente críticos, expostos à manipulação excessiva e, muitas vezes, colonizado por microbiota hospitalar. A vulnerabilidade de pacientes nessa idade, a pouca tolerância terapêutica, tempo de hospitalização e uso de agentes antimicrobianos constitui fatores de risco para aumentar a incidência de infecções nosocomiais.

A unidade de terapia intensiva é um parâmetro importante para o controle e tratamento de doenças severas, pois é um setor hospitalar que representa o que há de moderno na medicina para monitorar todos os sinais vitais do corpo¹⁹. A sepse foi a principal doença associada à mortalidade em unidades de terapia intensiva pediátrica, comprovando novamente a relação de altas prevalências de infecção nesse setor hospitalar⁶.

A prevalência de infecções em unidades de terapia intensiva é analisada também em outros trabalhos^{1, 2, 14, 17, 19}, pois, nesta unidade hospitalar, são freqüentes intervenções terapêuticas e médicas altamente agressivas, o aumento do número de dispositivos médicos invasivos, exposição da paciente à múltiplas terapias, e, por conseguinte, a idade do paciente, podendo ser um fator de risco para adquirir uma infecção por M.R.S.A. Na França, são realizados programas de controle de infecção nesse setor a fim de minimizar a ocorrência dessas infecções, devido a impactos sócio-econômicos e humanos de infecções nosocomiais que são freqüentes, aumentando a taxa de mortalidade e os gastos hospitalares²⁰.

Alguns fatores têm sido relacionados à incidência de infecções no sítio cirúrgico, como aqueles referentes ao agente infeccioso (tamanho do inóculo), e fatores inerentes ao paciente (doenças pré-existentes, desnutrição, etc.), ressaltando a importância de controle de infecções na clínica cirúrgica, mesmo que os dados relatam um pequeno aumento do índice de infecções por M.R.S.A., demonstrado no presente trabalho¹⁵.

Os dispositivos médicos que auxiliam ou monitoram funções básicas do corpo contribuem muito para o sucesso de tratamentos médicos, porém, ao atravessar barreiras defensivas naturais, esses dispositivos propiciam aos microrganismos um acesso a líquidos e tecidos que normalmente são estéreis, elevando os índices de infecção hospitalar, em especial, por M.R.S.A.^{2, 11}.

A incidência de resistência do *Staphylococcus aureus* à meticilina vem se apresentando crescente, principalmente em hospitais terciários e/ou de ensino; quando os casos estão associados a dispositivos médicos invasivos; em locais que possuem microrganismos resistentes, como no caso de unidades de terapia intensiva, sendo ela pediátrica ou adulta¹⁶. Uma importante via de disseminação de M.R.S.A. é o papel dos profissionais da saúde que atuam como portadores desse microrganismo²². Entretanto, a identificação e trata-

mento de portadores que atuam em unidades hospitalares não são rotineiras, favorecendo a distribuição desse agente infeccioso¹⁸. Em um surto ocorrido em um centro de tratamento intensivo de um hospital de ensino constatou-se que o provável reservatório epidêmico foi a colonização nasal de funcionários da unidade⁹.

Os pacientes infectados ou colonizados com M.R.S.A. devem ser isolados; programas educacionais a respeito da infecção devem ser realizados com pacientes, visitantes e funcionários da unidade, desde a lavagem das mãos até a utilização de equipamentos de proteção individual, minimizando as chances de disseminação desse agente infeccioso multirresistente¹³.

Este estudo evidencia que as medidas preventivas são indispensáveis para minimizar a ocorrência de infecções hospitalares. É fundamental que os profissionais de saúde estejam atentos aos problemas de infecções nosocomiais e tomem medidas a fim de reduzir o número de tais infecções, observando e praticando as orientações sobre o controle de infecções no ambiente hospitalar e, assim, promover melhor assistência aos pacientes.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Ensino Superior de Maringá, à professora MSc Louremi Bianchi Gualda de Souza, a MSc Rubia Andréia Falleiros de Pádua, à professora Dr^a Talma Reis Leal Fernandes, aos meus colegas, à minha família e, principalmente, a Deus, por me proporcionar mais essa vitória.

REFERÊNCIAS

- 1 BOYCE, J. M. et al. Do Infection Control Measures Work for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*?. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* v. 25, n. 5, p. 395-401, 2004.
- 2 BURTON, G. R. W. & ENGELKIRK, P. G. *Microbiologia para as ciências da saúde*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. ISBN: 85-277-1031-5
- 3 CDC. Center for Disease Control and Prevention. *Investigation and Control of Vancomycin-Intermediate and -Resistant Staphylococcus aureus: A Guide for Health Departments and Infection Control Personnel*. Atlanta, GA, 2004.
- 4 CHAMBERS, H. F. The Changing Epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging Infectious Diseases*. v. 7, n. 2, p. 178-182, March-April, 2001. Disponível em: <http://www.cdc.gov/eid>. Acesso em: 27 mar. 2006.
- 5 FERREIRA, A. W. & ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico Laboratorial*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2001.
- 6 EINLOFT, P. R. et al. Perfil epidemiológico de dezesseis anos de uma unidade de terapia intensiva pediátrica. *Revista de Saúde Pública*. v. 36, n. 6, p. 728-733, 2002.
- 7 FREUND, J. E. & SIMON, G. A. *Estatística Aplicada. Economia, administração e contabilidade*. 9. ed. Porto Alegre (RS): 2000. ISBN 85-7307-531-7
- 8 GARNER, J. S. et al. CDC definitions for nosocomial infections. *Am. J. Infect. Control.* v. 16, p. 128-140, 1998. In: VILLAS BÔAS, P. J. F. & RUIZ, T. Ocorrência de infecção hospitalar em idosos internados em hospital universitário. *Revista de Saúde Pública*. v. 38, n. 3, p. 372-378, 2004.

- 9 LOCKSLEY, R. M. et al. Multiply antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: introduction, transmission and evolution of nosocomial infection. *Ann.Int. Med.* N. 97, p. 317-324, 1982. In: FERREIRA, A. W. & ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico Laboratorial*. ed. 2, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2001.
- 10 LODISE, T. P. & MCKINNON, P. S. Prediction model to identify patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia at risk for methicillin resistance. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* v. 24, n. 9, p. 655-661, 2003.
- 11 MEDEIROS, A. C. et al. Infecção hospitalar em pacientes de hospital cirúrgico. *Acta Cirúrgica Brasileira*. v. 18, Supl. 1, p. 15-18, 2003.
- 12 MIMS, C. et al. *Microbiologia Médica*. 2. ed. São Paulo: MANole, 1999. ISBN: 85-204-0879-6
- 13 PAPIA, G. et al. Screening High-Risk Patients For Methicillin resistant *Staphylococcus Aureus* On Admission to the Hospital: is it Cost Effective? *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* v. 20, n. 7, p. 473-477, 1999.
- 14 PITTET, D. et al. Prevalence and Risk Factors for Nosocomial Infections in Four University Hospital in Switzerland. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* v. 20, n. 1, p. 37-42, 1999.
- 15 POVEDA, V. B.; GALVÃO, C. M. & HAYASHIDA, M. Análise dos fatores de risco relacionados à incidência de infecção do sítio cirúrgico em gastrocirurgias. *Rev. Esc. Enferm. USP*. v. 37, n. 1, p. 81-89, 2003.
- 16 QUESADA, R. M. B. et al. Culturas de pontas de cateteres venosos centrais e perfil de resistência aos antimicrobianos de uso clínico. *R. Brasil. Anal. Clin.* v. 37, n. 1, p. 45-48, 2005.
- 17 RIBAS, R. M. & GONTIJO, P. F. Comparing Hospital Infections in the Elderly versus Younger Adults: an Experience in a Brazilian University Hospital. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. v. 7, n. 3, p. 210-215, 2003.
- 18 TELLAROLLI, D. N.; FERREIRA, N. C.; RADDI, M. S. G. & SOARES, C. P. Avaliação citológica da mucosa nasal de portadores de *Staphylococcus aureus*. *R. Brasil. Anal. Clin.* v. 35, n. 3, p. 151-153, 2003.
- 19 TOUFEN JR., C.; HOVNANIAN, A. L. D.; FRANCA, S. A. & CARVALHO, C. R. Prevalence rates of infection in intensive care units of a therapy teaching hospital. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo*. v. 58, n. 5, p. 254—259, 2003.
- 20 VERDIER, R.; PARER, S.; JEAN-PIERRE, H.; DUJOLS, P. & PICOT, M. C. Impact of an Infection Control Program in an Intensive Care Unit in France. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* n. 27, p. 60-66, 2006.
- 21 VERONESI, R. & FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*. 2. ed. v. 1, São Paulo: Atheneu, 2004.
- 22 WILSON, W. R. & SANDE, M. A. *Doenças Infecciosas. Diagnóstico e Tratamento*. Porto Alegre (RS): Artmed, 2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dra. Beatriz Barros Figueiredo
Rua Antonio de Reis Coelho, 160
CEP. 79400-000 Coxém - MS

Prevalência de microrganismos em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no laboratório de análises clínicas da Universidade Paranaense – Umuarama – PR

Prevalence of de microorganisms in urinary tract infections of patients attended in the clinical analysis of the Paranaense University – Umuarama – PR

Erildo Vicente Muller¹; Dayani Fernanda dos Santos² & Nelton Anderson Baspalez Corrêa³

RESUMO - Infecção urinária é a presença de microrganismo na urina, e sua prevalência varia com o sexo e idade dos pacientes. O presente trabalho objetivou determinar a prevalência de infecção urinária no laboratório de análises clínicas da UNIPAR no município de Umuarama-Pr. Foram analisados 328 prontuários dos pacientes que realizaram exames de cultura de urina no ano de 2005. Durante este período foram identificados 52 casos de infecção urinária e foram encontrados os seguintes agentes etiológicos: *Escherichia coli* (36,55%), *Enterobacter sp.* (21,16%), *Klebsiella sp.* (17,30%), *Staphylococcus sp.*, (7,70%), *Citrobacter sp.* (5,76%), *Pseudomonas aeruginosa* (5,76%) *Burkholderia cepacia* (3,85%) *Proteus sp.* (1,92%). A maior prevalência de infecção urinária encontrado no presente estudo foi do gênero feminino com uma prevalência de 14,6%. A *Escherichia coli* foi o microrganismo prevalente causador desta infecção. Os resultados obtidos neste estudo são de muita valia, pois permitem aplicação de um tratamento mais adequado, evitando desta forma complicações e recidivas.

PALAVRAS-CHAVE - Infecção urinária /bactérias/; cultura.

SUMMARY - Urinary infection is the presence of microorganism in piss, e its prevalence varies with the sex and age of the patients. The present work objectified to determine the prevalence of infection would urinary in the laboratory of clinical analyses of the Unipar in the city of Umuarama-Pr. Had been analyzed 328 handbooks of the patients who had carried through examinations of piss culture in the year of 2005. During this period 52 cases of urinary infection had been identified and had been found the following agents etiologic: *Escherichia coli* (36.55%), *Enterobacter sp.* (21.16%), *Klebsiella sp.* (17.30%), *Staphylococcus sp.*, (7.70%), *Citrobacter sp.* (5.76%), *Pseudomonas aeruginosa* (5.76%) *Burkholderia cepacia* (3.85%) *Proteus sp.* (1.92%). The biggest prevalence of found urinary infection in the present study was of the feminine sort with a prevalence of 14,6%. The *Escherichia coli* were the .causing prevalent microorganism of this infection. The results gotten in this study are of much value, therefore they more allow application of an adjusted treatment, preventing in such a way complications and returns.

KEYWORDS - Urinary infection/bacteria; culture.

INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) pode ser definida como sendo a invasão e multiplicação de microrganismos nos tecidos do trato urinário, desde a uretra até os rins¹. A maioria das ITU, incluindo cistite, pielonefrite, bacteriúria assintomática e síndrome uretral aguda, são causadas por poucos gêneros bacterianos, a presença destes microrganismos na urina é denominado bacteriúria².

A ITU é uma patologia extremamente freqüente que ocorre em todas as idades, havendo, contudo, maior prevalência desse problema em três grupos etários: crianças até os seis anos de idade, mulheres jovens com vida sexual ativa, e adultos idosos com mais de 60 anos de idade³. No Brasil as ITUs são consideradas as mais comuns das infecções bacterianas responsáveis por 80 em cada 1.000 consultas clínicas³. Em recém nascidos, devido a um maior numero de más formações congênitas, especialmente a válvula de uretra posterior, acomete preferencialmente o sexo masculino (cerca de 75%)⁴. Em crianças acima de três meses de idade, cerca de 90% das ITUs se manifestam no sexo feminino⁴. Na vida adulta a incidência no sexo feminino se eleva, o que parece estar implicadas com início da vida sexual. Na mulher a uretra é mais curta, com isso é maior a proximidade do ânus com o vestíbulo vaginal e uretra. No homem, é maior o comprimento uretral, maior o fluxo urinário e o fator antibacteriano prostático são protetores, com isso a susceptibilidade a ITU na mulher é maior. Após 60 anos de idade a incidência de ITU aumenta podendo atingir entre 3% a 4% dos homens e que se relaciona com quadros de hiperplasia prostática^{3,4}.

As infecções do trato urinário não complicadas adquiridas na comunidade constituem atualmente a infecção mais comum em mulheres nos Estados Unidos, com mais de oito milhões de consultas por ano, sendo também, significante causa de morbidade e responsável por elevados custos em saúde⁵.

A urocultura é o exame considerado "padrão ouro" no diagnóstico laboratorial da ITU, sendo 40 a 70% dos espécimes clínicos enviados para os laboratórios de microbiologia⁶.

As ITUs são, em geral, causadas por bactérias Gram-negativas aeróbicas presentes na flora intestinal. Nas infecções urinárias agudas sintomáticas existe nítida predominância de *Escherichia coli*, enquanto que nas infecções crônicas ou adquiridas em ambiente hospitalar ou relacionadas com anomalias estruturais do trato urinário existe uma incidência mais eqüitativa das diferentes enterobactérias, com o aumento da prevalência de infecções causadas por *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.*, e por gram-positivos, como *Enterococos* e *Staphylococcus*³.

A caracterização das infecções do trato urinário se faz importante, pois, pode elucidar os principais fatores predisponentes a esta patologia, bem como, os microrganismos mais envolvidos e, a partir destes conhecimentos, pode-se direcionar as formas de terapia bem como as medidas de controle das infecções⁷.

O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência dos microrganismos responsáveis pelas infecções do trato urinário dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Paranaense em Umuarama – Paraná no período de janeiro a dezembro de 2005.

Recebido em 14/02/2007

Aprovado em 02/01/2008

¹Docente do departamento de Enfermagem e Saúde Pública da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). erildomuller@uepg.br

²Acadêmica do curso de farmácia e bioquímica da Universidade Paranaense (UNIPAR).

³Docente do curso de farmácia e bioquímica da UNIPAR – Campus Umuarama.

MATERIAIS E MÉTODOS

No período de janeiro a dezembro de 2005, foram analisados os resultados de 328 culturas de urina, de pacientes ambulatoriais, atendidos no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Paranaense (UNIPAR) em Umuarama, Paraná. As amostras foram constituídas de urina de jato médio. Os pacientes foram orientados para realizarem uma higienização prévia da região genital, principalmente no sexo feminino, desprezando o primeiro jato de urina e o restante da micção. As amostras de urina foram coletadas em frascos estéreis e encaminhadas para o setor de microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas da UNIPAR. A urocultura foi processada conforme descrito nos Procedimentos Operacionais Padrões (POP) do Laboratório de Bacteriologia da UNIPAR, utilizando a cultura quantitativa: as amostras foram semeadas através do método da alça calibrada de 0,01ml (10ul), em agar CLED (cistino-lactose eletrólito deficiente), ágar MacConkey. As culturas foram incubadas durante 24 – 48 hs, a 35°C+1°C. Após isolamento primário as amostras foram submetidas à identificação de acordo com PILONETO (1998)⁸. Foram consideradas positivas as urinas que apresentavam um crescimento igual ou superior de aproximadamente 10⁵ UFC/ml. Este trabalho foi realizado mediante aprovação do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da UNIPAR sob número 2065/2006 e, cumprido integralmente de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de prontuários analisados (328), houve 15,85% (n=52), resultados positivos, para as infecções do trato urinário. O predomínio das infecções do trato urinário ocorreu nas mulheres com 14,64% (n=48), sendo que a maioria encontrou-se na faixa etária de 01 a 46 anos (TABELA I). No gênero masculino a maior prevalência foi encontrada na faixa etária de 47 a 78 anos (TABELA II).

TABELA I

Distribuição de culturas positivas e negativas por faixa etária no gênero masculino atendidos no LAC da UNIPAR no período de janeiro a dezembro 2005.

GÊNERO MASCULINO					
IDADE	Prontuário analisado	Cultura Positiva	%	Cultura Negativa	%
01 – 15	11	1	1,89	10	18,9
16 – 30	8	0	0	8	15,09
31 - 46	16	0	0	16	30,2
47 - 62	7	1	1,89	6	11,32
63 - 78	9	2	3,77	7	13,2
79 - 94	2	0	0	2	3,77
TOTAL	53	4	7,5	49	92,5

TABELA II

Distribuição de culturas positivas e negativas por faixa etária no gênero feminino, atendidos no LAC da UNIPAR no período de janeiro a dezembro 2005.

GÊNERO FEMININO					
IDADE	Prontuário analisado	Cultura Positiva	%	Cultura Negativa	%
01 – 15	61	10	3,63	51	18,54
16 – 30	63	6	2,18	57	20,72
31 - 46	75	14	5,09	61	22,18
47 - 62	44	8	2,9	36	13,09
63 - 78	30	10	3,63	20	7,27
79 - 94	2	0	0	2	0,72
TOTAL	275	48	17,5	227	82,5

Os microorganismos mais frequentemente isolados foi a *Escherichia coli* 36,55% (n=19), seguido da *Enterobacter sp.* com 21,16% (n=11) e *Klebsiella sp.*, 17,30% (n=09), como pode ser observado na tabela III.

TABELA III

Prevalência dos germes isolados nas culturas de urina no Laboratório de Análises Clínicas da UNIPAR no período de janeiro a dezembro de 2005.

CULTURA	IDADE						Total	%
	01-15	16-30	31-46	47-62	63-78	79-94		
<i>Escherichia coli</i>	6	3	4	2	4	0	19	36,53%
<i>Enterobacter sp.</i>	0	3	4	1	3	0	11	21,16%
<i>Klebsiella sp.</i>	1	0	2	3	3	0	9	17,31%
<i>Staphylococcus sp.</i>	1	0	1	2	0	0	4	7,70%
<i>Citrobacter sp.</i>	0	0	2	1	0	0	3	5,77%
<i>P. aeruginosa</i>	1	0	0	0	2	0	3	5,76%
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	0	1	0	0	0	2	3,85%
<i>Proteus sp.</i>	1	0	0	0	0	0	1	1,92%
TOTAL	11	6	14	9	12	0	52	100%

A infecção urinária é uma patologia extremamente freqüente e constituem um grave problema de saúde que afeta milhões de pessoas a cada ano. Essas infecções são responsáveis por aproximadamente 20% de todas as consultas pediátricas. As ITUs crônicas constituem importante causa de insuficiência renal terminal, hemodiálise e transplante renal⁹. A prevalência de urocultura positiva encontrado neste estudo se assemelha a vários trabalhos descritos^{10,11}. Neste estudo foi evidenciado maior predomínio de infecção urinária em pacientes do gênero feminino, esse fato pode ser explicado devido às mulheres serem mais suscetíveis a este tipo de infecção por diversos fatores, entre eles pode-se citar: anormalidades anatômicas do trato urinário; as condições de higiene após as relações sexuais. O uso de preservativo que contem espermicidas pode favorecer a infecção, pois o espermicida altera o pH e conseqüentemente a flora vaginal (perda de lactobacilos que mantém a acidez vaginal) favorecendo a ascendência de germes no trato urinário. Na gravidez ocorre a dilatação fisiológica do ureter e pelve renal facilitando o refluxo. Na menopausa ocorre a falta de estrogênio que facilitaria a remoção das bactérias através do estímulo de crescimento e proliferação da mucosa vaginal^{10,16}.

Na mulher a uretra é mais curta, com isso é maior a proximidade do ânus com o vestíbulo vaginal e uretra, aumentando a susceptibilidade da infecção urinária^{10,12}.

Nos homens, foi verificado que as infecções urinárias são menos freqüentes (7,7%). Entre os 53 prontuários analisados do gênero masculino, apenas 4 (7,5%) apresentou cultura positiva. Isto pode ser explicado, pelo fato que no homem é maior o comprimento uretral, maior o fluxo urinário e o fator antibacteriano prostático são protetores.

A maior prevalência de cultura positiva no gênero masculino situou-se na faixa etária de 47 a 78 anos. Isto pode estar relacionado a quadros de hipertrofia prostática, que obstru-

em o fluxo urinário causando esvaziamento vesical incompleto e conseqüentemente a infecção urinária. A *Escherichia coli* é um microorganismo pertencente à flora normal do intestino humano podendo contaminar e subsequentemente causar infecções extra-intestinais, sendo um dos principais agentes etiológicos de infecção no trato urinário¹⁰.

Outro índice encontrado é a infecção causada pela *Enterobacter sp.* (21,16%), classificada como a segunda cultura mais encontrada, este dado é muito importante, pois na literatura consta que o segundo microorganismo mais isolado na infecção urinária é a *Klebsiella sp.*^{13,14,16}. No presente estudo este microorganismo foi identificado como a terceira causa deste tipo de infecção com uma freqüência de 17,30%, sendo o maior índice encontrado em pacientes numa ampla faixa etária, variando de 31 a 78 anos. Foram encontrados, também, cultura de *Staphylococcus sp.* (7,70%), segundo a literatura, reconhecido como o principal agente etiológico das infecções urinárias em mulheres e jovens sexualmente ativas^{12,13,14}. A *Citrobacter sp.* e *Pseudomonas aeruginosa* foram o quinto tipo de cultura mais encontrada (5,76%). A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é frequentemente encontrada, em pequeno número, na microbiota intestinal normal e na pele dos seres humanos. É distribuída amplamente na natureza, sendo comum seu achado em ambiente úmido nos hospitais. Ela só se torna patogênica quando introduzida em áreas desprovidas de defesas normais, por exemplo, quando são utilizados cateteres urinários¹⁵.

Pode-se concluir com esse estudo, que a prevalência de ITU, e os microorganismos relacionados a ela podem variar de acordo com a localidade, gênero e idade dos pacientes, assim é importante o conhecimento da prevalência de patógenos locais e também do perfil de suscetibilidade para instituição do tratamento mais adequado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a UNIPAR, aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas, em especial ao prof. Francisco Matumoto pela colaboração.

REFERÊNCIAS

1. Thompson, Jr, R.B.; Miller, M. Specimen Collection, transport, and processing: Bacteriology in Manual of Clinical Microbiology. 8a ed. Washington, D.C (Eds). American Society for microbiology, 2003. p 320-321.
2. Cardoso, C. L.; Muraro, C. B.; Siqueira, V. L. D.; Guilherme, M. Simplified Technique for detection of significant Bacteriuria by Microscopic Examination of urine. J. Clin. Microbiol. 36(3): 820-823, 1998.
3. Dalbosco, V.; Srougi, M.; Dall'Oglio, M.; et. al., Infecções do Trato Urinário. Rev. Bras. Med, 60. (6): 320-336, 2003.
4. Heilberg, I P.; Schor, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato Urinário (ITU). Rev. Assoc. Bras. Med. 49 (1): 109-116, 2003.
5. Gupta, K.; Hooton, T. M.; Stamm, W. increasing Antimicrobial resistance and the Management of Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infection. Ann. Intern. Med., 145: 41-50, 2001.

6. Martino, M. D. V.; Toporovski, J.; Mímica, I. M. Métodos bacteriológicos de triagem em infecções do trato urinário na infância e adolescência. J. Brás. Nefrol. 24(2): 71-80, 2002.
7. Sader, H. S.; et al. Pathogen Frequency and resistance patterns in Brazilian Hospitals: Summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. BJID, 5(4) 200-214, 2001.
8. Pilonetto, M. Manual de procedimentos laboratoriais em POPs em microbiologia. Microscience, 1998.
9. Andrade, E. A, infecção do trato urinário na Infância. Medicina on line – Revista Virtual de Medicina 1(2):abr, mai, junh, 1998 in Hörner R.; Vissoto R.; Mastella A et al. Prevalência de microorganismos em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria, Revista Brasileira de Análises Clínicas. 38(3): 147-150, 2006.
10. Kazmirczak, A.; Giovelli, F. H.; Goulart, L. S.; et. al., Caracterização das infecções do trato Urinário Diagnosticadas no Município de Guarani das Missões – RS. RBAC, 37 (4): 205-207, 2005.
11. Poletto, K. Q.; Reis, C. Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na cidade de Goiânia, Goiás. Ver. Soc. Brás. Méd. Trop., set. / out. 2005, 38(5): 416-420.
12. Oresteim, R. D.; Wong, E. M. D. Urinary tract infections in adults. American Farm. Physician. 1, 1999
13. Camargo, I. L.; Baratella C; Machieto, A.; Diagnostico Bacteriológico das infecções do trato urinário: uma revisão técnica. Rev. Medicina. 34(1): 70-78, 2001.
14. Guidoni, E. B. M.; Toporovski, J. infecção urinária na adolescência. J. pedi-atr. 77: 165-169, 2001.
15. Menezes, E. A.; Brasil, J. S.; Rocha, M. V. A. P. et. al. Infecção urinárias por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes cateterizados na Clínica de Urologia da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza-Ceará. RBAC, 35(2): 77-79, 2003.
16. Duarte, G.; Marcolin, A. C.; Gonçalves, C. V. infecção Urinário na Gravidez: Análise dos Métodos para diagnóstico e do tratamento. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 24 (7), 2002.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dr. Erildo Vicente Muller

Av. XV de Novembro, 2211

CEP. 85140-000 Candói - PR

PRÊMIO CFF

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio Conselho Federal de Farmácia - CFF é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC, com o patrocínio do Conselho Federal de Farmácia;
- 2) O Prêmio será no valor de R\$ 5.000,00, além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

- O Prêmio Conselho Federal de Farmácia - CFF tem por objetivos;
- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas de Farmacêuticos-bioquímicos na área de Citologia no País; e
 - 2) Premiar o melhor trabalho de Farmacêutico-bioquímico sobre Citologia inscrito e apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, os trabalhos inscritos e apresentados no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores Farmacêuticos-bioquímicos deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas, contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (uniterms) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado na íntegra, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio CFF, poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio CFF, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio do CFF é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio CFF, obrigatoriamente, deve ser apresentado na sessão de Temas Livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio CFF

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • Rio de Janeiro • RJ • 20270-902

Determinação do intervalo de referência para o volume plaquetário médio (VPM) utilizando o analisador hematológico Pentra 120 ABX

Determining the reference interval for the mean platelet volume (MPV) making use of the hematology analyzer Pentra 120 ABX

Mariela Granero Farias* & Suzane Dal Bó*

RESUMO - De todos os parâmetros fornecidos pelos analisadores hematológicos, os índices plaquetários, certamente, são os mais ignorados pela maioria dos laboratórios clínicos, devido à dificuldade de padronização e por serem afetados por uma série de problemas metodológicos. Recomenda-se, portanto que cada laboratório determine seu próprio intervalo de referência. Destes índices, o volume plaquetário médio (VPM) vem merecendo destaque pela sua grande utilidade, além de trombose e hemostasia, em uma série de doenças como, diabetes, doenças da tireóide, doenças vasculares, etc. Neste estudo foram analisadas 227 amostras de indivíduos adultos, ambulatoriais, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), executadas no analisador hematológico Pentra 120 ABX, com a finalidade de determinar o intervalo de referência para este parâmetro, permitindo assim, sua utilização no hemograma e sua aplicação clínica. O valor de referência para VPM encontrado neste estudo foi de 6,5 - 9,5 fL, sendo calculado a partir dos percentis 2,5-97,5 e determinado conforme recomendação do International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). O valor obtido foi correspondente aos encontrados em estudos anteriores, os quais também utilizaram a metodologia de impedância volumétrica, para a realização das contagens plaquetárias.

PALAVRAS-CHAVE - plaquetas, volume plaquetário médio, impedância, intervalo de referência.

SUMMARY - Among all the parameters provided by the haematology analysers, the platelet rate is surely, the least acknowledged one, by most of the clinic laboratories, due to the standardization difficulty and also for being affected by a series of methodologic problems. Therefore, every laboratory would be in charge to determine its own reference interval. Among those rates, the mean platelet volume (MPV) should be emphasized due to its high level of importance in a series of pathologies; such as thrombosis and hemostasis, diabetes, thyroid and vascular diseases, etc. In this study, 227 adult outpatients samples from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) have been analysed and with the Pentra 120 ABX hematological analyser, in order to determine the reference interval for this standard, thus allowing for its utilization in the hemogram as well as its clinical application. The MPV reference interval found in this study was 6,5 - 9,5 fL, according to percentile 2.5-97.5 and determined according to recommendation of the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). The value obtained corresponds to the ones found in previous studies, which have also used the volumetric impedance methodology for platelet count.

KEYWORDS - platelets, mean platelet volume, impedance, reference interval.

INTRODUÇÃO

Plaquetas são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos,^{13,28} que apresentam forma discóide, diâmetro normalmente de 1,5 a 3 µm, espessura em torno de 1,0 µm e volume de 7,0 fL. Em condições normais, estão em número de 140.000 a 400.000/µL no sangue periférico.²⁸ São componentes do sangue especializados, que ajudam a prevenir a hemorragia.¹³ O primeiro método de referência para a determinação de plaquetas foi a contagem manual por microscopia de contraste de fase.^{7,23} Em 2001, o International Council for Standardization in Haematology (ICSH) propôs um novo método, baseado na detecção imunológica por citometria de fluxo, usando isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado com anticorpo monoclonal CD61.^{12,16,20} Porém, os princípios utilizados para contagem plaquetária pela maioria dos analisadores hematológicos são a impedância eletrônica, a densidade óptica (light scatter) ou associação das duas metodologias.^{2,23} O equipamento Pentra 120 ABX, utiliza o princípio da contagem por impedância, que é baseada na análise dimensional, na qual as plaquetas são identificadas pelo seu tamanho. Algum tempo atrás, os estudos sobre plaquetas limitavam-se, principalmente, a contagem de plaquetas/mm³ e as referências morfológicas sobre: macroplaquetas, agregados plaquetários, satelitismo plaquetário etc. Recentes avanços da automação na análise de células sanguíneas permitem a medição automática de vários parâmetros plaquetários.¹⁵ Entre os novos índices vem merecendo destaque o volume plaquetário médio (VPM), por se tratar de uma variável bi-

ológica que se relaciona a função e atividade plaquetária.²² A avaliação do tamanho e morfologia das plaquetas torna-se útil no diagnóstico de pacientes com várias alterações plaquetárias, por isso o VPM é de grande importância particularmente nas trombocitopenias e trombocitoses. Anormalidades clínicas significativas também podem ser detectadas, quando a contagem de plaquetas estiver dentro dos limites normais.⁵ Muitos laboratórios ignoram a informação do VPM, gerada em analisadores hematológicos, pois o método é de difícil padronização e quando determinado em amostras de rotina é afetado por numerosas variáveis, como o tipo de tecnologia, populações de pacientes e as pertencentes à própria coleta (complexidade dos efeitos dos anticoagulantes e as variáveis pré-analíticas como, temperatura e o tempo de estocagem do material).^{10,11} Em virtude desses problemas e da dificuldade de interpretação da heterogeneidade do tamanho plaquetário sob condições normais e anormais, essas medidas são interpretadas com extrema cautela,¹⁷ sendo aconselhável que cada laboratório estabeleça seu próprio valor de referência.⁵ O objetivo deste estudo foi determinar o valor de referência do VPM, dos pacientes do HCPA, para validar o parâmetro, adicionar nos laudos e possibilitar a sua aplicação clínica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta da amostra

Foram analisadas 227 amostras de pacientes ambulatoriais (Figura 1), 104 pacientes do sexo masculino e 123 do sexo feminino, com idade entre 13 e 95 anos.

Recebido em 27/12/2006

Aprovado em 22/10/2007

*Unidade de Hematologia, Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Todos os casos apresentavam valor de hemoglobina entre 10,5 a 16,0 g/dL. Foram excluídas amostras de pacientes ambulatoriais com dados clínicos relevantes (diabéticos, cardíacos, HIV, gestantes, doenças da tireóide) e aquelas cuja análise em lâmina apresentou alteração na morfologia e tamanho plaquetário.

As amostras de sangue venoso, foram colhidas em tubos a vácuo (volume de ± 5 ml), com o anticoagulante etilenedinitrotetraacetato tripotássio (K_3 EDTA), mantidas a temperatura ambiente e processadas, dentro de no máximo duas horas após a coleta.

Metodologia

Os exames foram realizados nos analisadores hematológicos Pentra 120 ABX e Pentra Retic 120 ABX (ABX Diagnostic, Montpellier, France), sendo avaliados os seguintes parâmetros: contagem de plaquetas (PLT/ mm^3) e volume plaquetário médio (VPM/fL). Os equipamentos utilizados apresentaram controle de qualidade, intra e inter-ensaio com um bom desempenho diário.

O histograma plaquetário é uma curva em que cada plaqueta classifica-se e distribui-se de acordo com o seu tamanho (volume) (Figura 2). O VPM é diretamente derivado da análise da curva de distribuição plaquetária.

Avaliação cuidadosa do esfregaço sangüíneo foi realizada, para observação da morfologia plaquetária e somente foram incluídas no estudo amostras com histograma plaquetário log-normal.

Estatística

O intervalo de referência foi determinado através do programa SPSS® versão 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), sendo calculado a partir dos percentis 2,5 - 97,5, dentro de 95% do intervalo de confiança,^{24,25} segundo recomendação do International Federation of Clinical Chemistry (IFCC).^{8,21,24,25}

RESULTADOS

A contagem plaquetária média foi de $249.000 \times 10^3/\text{mm}^3$. O VPM apresentou correlação inversamente proporcional à contagem plaquetária. O intervalo de referência para o parâmetro VPM foi de 6,5- 9,5 fL, para indivíduos adultos do HCPA. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos feminino e masculino.

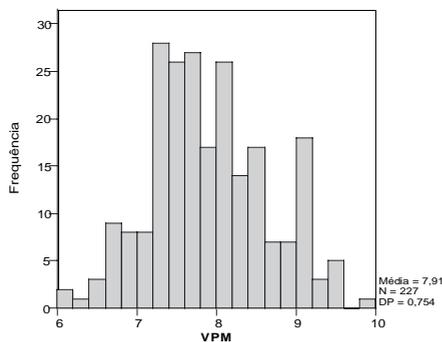


Figura 1 - Histograma de distribuição de 227 pacientes com VPM entre 6,0 e 10,0 fL.

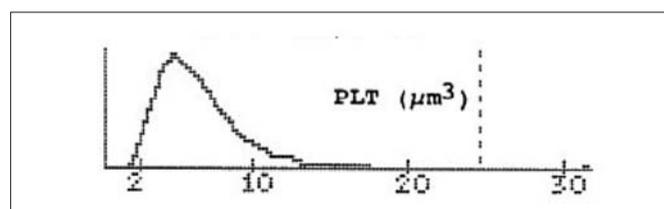


Figura 2 - Histograma de distribuição plaquetária log-normal

Por muito tempo os estudos referentes a plaquetas, relacionavam-se somente a trombose e hemostasia. Atualmente está claro que, as plaquetas têm um papel importante em diversas desordens caracterizadas por doenças vasculares, incluindo doença arterial coronária, doenças mieloproliferativas, diabetes, pré-eclâmpsia, doença intestinal inflamatória, entre outras.⁹ O uso do VPM determinado através contadores de sangue automatizado melhorará a descrição de doenças plaquetárias.¹

Embora o EDTA seja o anticoagulante de rotina mais utilizado para contagem de células sangüíneas, ele pode induzir alterações na forma e ultra-estrutura das plaquetas. Plaquetas coletadas com este anticoagulante se alteram com o tempo e temperatura,^{3,19} se tornando esféricas e quando coletadas com citrato tornam-se discóides.^{3,14,18} Esta alteração na forma causa um aumento aparente de aproximadamente 20% no VPM nas duas primeiras horas em exposição ao EDTA em relação às amostras coletadas com citrato.¹⁸

Estudos anteriores relatam que o valor de VPM aumenta devido ao inchaço plaquetário quando o EDTA é usado como anticoagulante, entretanto, um estudo recente mostra que este aumento de tamanho é de aproximadamente $<0,5$ fL, quando a análise é realizada dentro de 2 horas após a venipuntura.⁶ Neste estudo, todas as amostras de sangue foram analisadas no período de no máximo 2 horas após a coleta.

São chamadas de plaquetas grandes aquelas que apresentam um tamanho de 4 a 7 μm de diâmetro e plaquetas gigantes as maiores que 7 μm , geralmente 10 a 20 μm de diâmetro. Embora a avaliação cuidadosa do seu diâmetro em uma distensão sangüínea por um micrômetro ocular é rápida e acurada, ela é subjetiva, pois a morfologia plaquetária é enganosa, para a estimativa do tamanho da plaqueta. Plaquetas grandes são mais atrativas que as pequenas, então freqüentemente uma distensão é lida mostrando inadequadamente "plaquetas gigantes".⁴ Uma das razões mais importantes para as contagens automatizadas é o baixo erro estatístico devido ao grande número de células examinadas.

O histograma do volume de distribuição plaquetária é de particular importância. Quando este for de forma log-normal, a contagem de plaquetas e o VPM refletem valores reais. Em contraste, quando a distribuição não é log-normal, a contagem de plaquetas e o VPM estão representando interferentes. A avaliação microscópica da lâmina, embora menos precisa, também é de grande utilidade para identificação destas alterações. No nosso estudo, entraram somente pacientes com histograma plaquetário log-normal, com a finalidade de eliminar qualquer interferente e também foi realizada a análise cuidadosa do esfregaço sangüíneo.

Numerosos fatores podem contribuir para a diferença entre os intervalos de referência relatados em diferentes estudos, como por exemplo, voluntários para o estudo, o método analítico, variáveis pré-analítica e a maneira como o intervalo de referência foi calculado. Como a determinação do intervalo de referência para o VPM é metodologia dependente, métodos como impedância e o método de referência, citometria de fluxo podem apresentar uma diferença acima de 40%.²⁶

O método estatístico utilizado em nosso estudo, para cálculo do IR (intervalo de referência) para o VPM foi baseado nas recomendações do CLSI e IFCC.²⁵ Segundo estas recomendações, o IR deve ser calculado para população total.²⁶ O cálculo foi realizado dentro de um intervalo de confiança de 95%. O valor de VPM encontrado para os pacientes do HCPA (6,5-9,5) foi próximo aos obtidos em estudos anteriores realizados com o mesmo tipo de equipamento, como o valor relatado por *Van den Bossche et al* (6,8-10,0).²⁶

REFERÊNCIAS

- Bessman JD. Automated Blood Counts and Differentials - A practical Guide. 57-83, 1986.
- Briggs C, Harrison P, Grant D, Staves J, Machin SJ. New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter - the XE 200TM. *Clin Lab Med* 2000; 22: 345-350.
- Brummitt DR & Barker HF. The determination of a reference range for new platelet parameters produced by the Bayer ADVIATM 120 full blood count analyser. *Clin Lab Haem* 2000; 22: 103-107.
- College of American Pathologists. Surveys & Anatomic Pathology Education Programs. Hematology, clinical microscopy, and body fluids glossary 2005; pg 11.
- Dow RB. The clinical and laboratory utility of platelet volume parameters. *Aus J Med Sci* 1994; 15:1-18.
- Endler G, Klimesch A, Sunder-Plassmann H, Schillinger M, Exner M, Manhalter C. Mean platelet volume is an independent risk factor for myocardial infarction but not for coronary artery disease. *Br J Haematol* 2002; 117: 399-404.
- Felle P, McMahon C, Rooney S, Donnelly P, Ni Chonchubhair F. Platelets in the paediatric population: the influence of age and the limitations of automation. *Clin Lab Haem* 2005; 27: 250-257.
- Fuentes-Arderiu X, Mas-Serra R, Alumá-Trullàs A, Martí-Marcet MI, Dot-Bach D. Guideline for the production of multicentre physiological reference values using the same measurement system. A proposal of the Catalan Association for Clinical Laboratory Sciences. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42(7): 778-782.
- Giacomini A, Legovini P, Gessoni G, Antico F, Valverde S, Salvadego MM et al. Platelet count and parameters determined by the Bayer ADVIATM 120 in reference subjects and patients. *Clin Lab Haem* 2001; 23: 181-186.
- Gulati GL, Hyland LJ, Kocher W, Schwarting R. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 336-342.
- Harker LA, Roskos LK, Marzek UM, Carter RA, Cherry JK, Sundell B et al. Effects of megakaryocyte growth and development factor on platelet production, platelet life span, and platelet function in healthy human volunteers. *Blood* 2000; 95: 2514-2522.
- Harrison P, Horton A, Grant D, Briggs C, Machin S. Immunoplatelet counting: a proposed new reference procedure. *Br J Haematol* 2000; 108: 228-235.
- Hartwig J & Italiano JR J. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost* 2003; 1:1580-1586.
- Henry JB. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 20th ed. Ed Saunders, pg 448, 2001.
- Kaito K, Otsubo H, Usui N, Yoshida M, Tanno J, Kurihara E. Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2005; 128:698-702.
- Kunz D, Kunz WS, Scott CS, Gressner AM. Automated CD61 immunoplatelet analysis of thrombocytopenic samples. *Br J Haematol* 2001; 112: 584-592.
- Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. *Wintrobe Hematologia Clínica*. 1 ed. Ed São Paulo: Manole, 1998.
- Macey M, Azam U, McCarthy D, Webb L, Chapman ES, Okrongly D et al. Evaluation of the anticoagulants EDTA and Citrate, Theophylline, Adenosine, and Dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the Advia 120 hematology system. *Clin Chem* 2002; 48 (6): 891-899.
- Nishioka T, Yokota M, Tsuda I, Tatsumi N. Flow cytometric analysis of platelet activation under calcium ion-chelating conditions. *Clin Lab Haem* 2002; 24: 115-119.
- Norris S, Pantelidou D, Smith D, Murphy MF. Immunoplatelet counting: potential for reducing the use of platelet transfusions through more accurate platelet counting. *Br J Haematol* 2003; 131: 605-613.
- Poulsen OM, Holst E, Christensen JM. Calculation and application of coverage intervals for biological reference values. *Pure & Appl Chem* 1997; 69(7): 1601-1611.
- Santos EV & Filho JM. Plaquetograma em gestantes normais e com pré-eclâmpsia. *RBGO* 2004; 26(3): 2001-206.
- Segal HC, Briggs C, Kunka S, Casbard A, Harrison P, Machin SJ, Murphy MF. Accuracy of platelet counting haematology analysers in severe thrombocytopenia and potential impact on platelet transfusion. *Br J Haematol* 2005; 128: 520-525.
- Solberg HE. RefVal: a program implementing the recommendation of the International Federation of Clinical Chemistry on the statistical treatment of reference values. *Comput Methods Programs Biomed* 1995; 48: 247-256.
- Solberg HE. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal Program. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42(7): 710-714.
- Van den Bossche J, Devreese K, Malfait R, Van de Vyvere M, Wauters A, Neels H et al. Reference intervals for a complete blood count determined on different automated haematology analysers: ABX Pentra 120 Retic, Coulter Gen-S, Sysmex SE 9500, Abbott Cell Dyn 4000 and Bayer Advia 120. *Clin Chem* 2002; 40(1): 69-73.
- Vogelaar SA, Posthuma, Boomsma D, Kluijff C. Blood stability at room temperature for counting red and white blood cells and platelets. *Vascul Pharmacol* 2002; 39: 123-125.
- Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia: fundamentos e prática*. 1 ed. Ed São Paulo: Atheneu, pg 735, 2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Mariela Granero Farias
 Unidade de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica.
 Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
 Rua Ramiro Barcelos, 2350
 CEP 90035-903 - Porto Alegre - RS
 Fone: (51) 2101.8674
 E-mail: mg.farias@yahoo.com.br

PRÊMIO PNCQ

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio PNCQ é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, com o patrocínio do Programa Nacional de Controle de Qualidade - PNCQ;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a R\$ 5.000,00 (cinco mil reais), além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

O "Prêmio PNCQ" tem por objetivos;

- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Controle de Qualidade no País; e
- 2) Premiar o melhor trabalho sobre controle de qualidade inscrito e apresentado na sessão de Temas Livres dos CBAC, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas, contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e keywords (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado na íntegra, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio PNCQ, poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio PNCQ, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio PNCQ é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio PNCQ obrigatoriamente, deve ser apresentado em sessão de Temas Livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio PNCQ

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • 20270-902 • Rio de Janeiro • RJ

Gestação e papilomavírus humano: influência da idade materna, período gestacional, número de gestações e achados microbiológicos*

Pregnancy and human papillomavirus: influence of maternal age, gestational period, number of pregnancies and microbiological findings

Luiz Mário da Silva Silveira¹; Roxana de Carvalho Veras²; América de Lourdes Nogueira da Cruz² & Manuel dos Santos Faria³

RESUMO - O papilomavírus humano (HPV) exerce um papel central na carcinogênese do colo uterino. Muitos fatores orbitam em torno dele que influenciam direta ou indiretamente a instalação deste mecanismo no epitélio escamoso cervical. Estudos demonstraram haver uma maior frequência de infecção por HPV em gestantes em relação a não-gestantes, sugerindo que a gravidez é um fator de risco para infecção pelo HPV. É objetivo deste trabalho avaliar retrospectivamente um grupo de gestantes com efeito citopático para HPV, atendidas na Maternidade Marly Sarney no período de 2000 a 2004, verificando os possíveis efeitos da idade, período gestacional, número de gestações e achados microbiológicos mais frequentes. Verificou-se que o efeito citopático para HPV foi mais prevalente nas gestantes que tinham idade igual ou superior a 20 anos, que estavam na primeira metade da gestação, havendo uma diminuição da frequência da infecção com o aumento da paridade. Dentre os agentes microbiológicos de importância comumente encontrados *Gardnerella vaginalis* foi o que apresentou maior prevalência.

PALAVRAS-CHAVE - Papilomavírus humano, HPV, gestantes.

SUMMARY - Human Papillomavirus (HPV) plays a central role in uterine cervix carcinogenesis. A lot of factors direct or indirectly influence the presence of this mechanism in cervical squamous epithelium. Studies prove that there is a large number of HPV infections in pregnant women than in no-pregnant women, and it is suggested that the pregnancy is a risk factor for HPV infection. It is purpose of this study evaluate a group of pregnant women with HPV infection, attending at the Marly Sarney Maternity from 2000 to 2004. It was verified the effects of maternal age, stage of pregnancy, number of pregnancies and more frequent microbiological agents. It was found that HPV infection was more frequent in pregnant women with equal age or older than 20 years old in the first half of gestation; it was observed a reduction of frequency of infection with increase of gestation number. *Gardnerella vaginalis* was the most important microbiological agent found.

KEYWORDS - Human Papillomavirus, HPV, pregnant women.

INTRODUÇÃO

Os cânceres mamários e genitais são os tumores mais frequentes entre as mulheres. O câncer cervical, com uma incidência mundial de cerca de 500.000 casos por ano, constitui-se em um dos mais graves problemas de saúde pública, especialmente para os países em desenvolvimento. A incidência do carcinoma cervical varia nas diferentes populações, refletindo diretamente a exposição aos fatores de risco e qualidade de programas de rastreamento^{1, 14, 15}.

Durante os últimos anos, a incidência e mortalidade por câncer cervical nos Estados Unidos e outros países desenvolvidos estão diminuindo notavelmente. Entretanto, nos países em desenvolvimento, esta patologia não tem apresentado uma importante diminuição. Em algumas regiões geográficas, como no nordeste brasileiro, a incidência do câncer do colo do útero é a mais alta do mundo, estimando-se que em torno de 40.000 mulheres por ano desenvolverão esta neoplasia no Brasil^{15, 16, 17}.

O câncer do colo do útero é considerado uma neoplasia que pode ser prevenida, uma vez que estes tumores têm uma progressão relativamente lenta e existe uma forma simples e eficiente de detecção das lesões precursoras. O seu perfil epidemiológico é de uma doença relacionada à atividade sexual, etiologicamente relacionada a um agente sexualmente transmissível, o papilomavírus humano (HPV)¹⁵.

Nos últimos anos, observou-se uma verdadeira epidemia com a descoberta das lesões subclínicas pelo HPV e suas associações com a chamada "revolução sexual" do final do século XX. Foram os trabalhos pioneiros de Koss e Meisels, entre outros, que notificaram a comunidade médica sobre

uma nova realidade epidemiológica e sobre o fato de que se dispunha de meios capazes para, com relativa simplicidade, fazer o diagnóstico precoce ou levantar a suspeita de infecção pelo HPV^{4, 22}.

As lesões oriundas de infecção pelo HPV provocam, geralmente, alterações morfológicas características, onde células superficiais, intermediárias e endocervicais apresentam alterações na forma e tamanho do núcleo, hiper cromatismo, cromatina granulosa e grosseira, detectáveis em citologia de raspados cervicovaginais e biópsia; com isso, são de suma importância os exames rotineiros de detecção precoce de câncer através de esfregaços corados pelo Papanicolaou, sendo dessa forma também muito útil na identificação de alterações citomorfológicas relacionadas ao HPV^{7, 21}.

As lesões relacionadas à infecção pelo HPV podem ser encontradas na pele no aparelho respiratório, bexiga urinária e nos tratos anogenitais masculinos e femininos. É muito interessante que os diferentes tipos de HPVs mostram uma preferência, muitas vezes exclusiva, pelo tecido que infectam. O papilomavírus humano exerce um papel central na carcinogênese do colo uterino. Entretanto a infecção por HPV não é suficiente para desenvolver o carcinoma da cérvix. São necessárias mutações genéticas adicionais nas células infectadas para ocorrer o câncer. O mais evidente é que o HPV exerce sua influência oncogênica através das proteínas E6 e E7, que estimulam a proliferação celular e a perda de diferenciação^{16, 21}.

Muitos fatores orbitam em torno do câncer e influenciam direta ou indiretamente a instalação deste mecanismo no epitélio escamoso cervical. Entre eles estão fatores imunológicos (resposta imune local e humoral), comportamento sexual,

Recebido em 06/12/2006

Aprovado em 03/09/2007

*Trabalho realizado na Maternidade Marly Sarney - MA.

¹Professor do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

²Farmacêuticas-Bioquímicas do Laboratório INLAB-MA. ³Diretor-Geral do Laboratório INLAB-MA.

idade, infecções genitais causadas por agentes sexualmente transmissíveis (*Chlamydia* e Herpes), gravidez, paridade, uso de contraceptivos orais por muito tempo, tabagismo, imunodeficiências, desnutrição e outras. Todos esses fatores interagem em menor ou maior intensidade com oncoproteínas e outros elementos do HPV, potencializando a ação do vírus na célula hospedeira e facilitando o desenvolvimento dos processos de imortalização e carcinogênese^{1, 4, 13, 16}.

A prevalência de infecção pelo HPV em mulheres grávidas é relevante, mas similar àquela encontrada em mulheres não-gestantes. As manifestações clínicas e subclínicas são mais evidentes nas gestantes, sendo que grande parte delas regridem no puerpério. Porém estudos demonstraram haver uma maior frequência de infecção por papilomavírus humano em gestantes em relação a não-gestantes sugerindo que a gravidez é um fator de risco para infecção pelo HPV^{4, 5}.

A alta prevalência da infecção por HPV e o aumento do percentual de replicação durante a gravidez podem ser devidos em parte à diminuição da imunidade celular e modificação dos hormônios esteróides. Isso se deve ao fato de o HPV possuir um receptor hormonal esteroidal. Além disso, altos níveis de hormônios esteróides produzem diminuição da síntese e atividade dos linfócitos e macrófagos. Assim, na gestação há depressão transitória e seletiva da imunocompetência celular. A atividade dos linfócitos T helper e T supressor está diminuída, assim como há diminuição da IgG e IgA no muco cervical. Também foi sugerido efeito direto da gravidez sobre a vulnerabilidade epitelial cervical, como resultado da instabilidade no genoma do hospedeiro, promovendo a progressão à malignidade^{1, 3}.

As manifestações clínicas da infecção pelo HPV devem ser pesquisadas durante a avaliação pré-natal rotineira, sobretudo através de exame ginecológico e perianal cuidadosa, seguido de coleta para a colpocitologia oncológica. Essa deve ser realizada com espátula de Ayre, na ectocérvice, postergando-se a coleta de amostra endocervical com escova apropriada para o puerpério⁴.

Este trabalho tem como objetivo avaliar retrospectivamente um grupo de gestantes com a presença e ausência de efeito citopático para papilomavírus humano, verificando os possíveis efeitos da idade, período gestacional, número de gestações e achados microbiológicos mais frequentes.

METODOLOGIA

Analisou-se retrospectivamente 841 colpocitologias oncológicas de mulheres gestantes atendidas na Maternidade Marly Sarney no período de 2000 a 2004. Verificou-se que desse total, 41 apresentavam efeito citopático para HPV segundo os critérios pesquisados por Schneider *et al.*²⁰. Esses critérios são baseados nos critérios clássicos ou pelo menos na presença de seis dos critérios não clássicos. O grupo controle consistiu de pacientes gestantes sem sinais citológicos de infecção pelo HPV, atendidas no mesmo período.

Processamento das amostras

Os esfregaços avaliados foram corados pelo método de Papanicolaou, montadas em Entellan® e identificados com os números cadastrados de acordo com a rotina adotada pelo Laboratório INLAB Investigação Laboratorial LTDA.

Coleta de dados

Os dados referentes ao efeito citopático para o HPV e a microbiota vaginal foram obtidos dos laudos das pacientes atendidas no Laboratório INLAB.

Os dados clínicos referentes à idade, período gestacional

(primeira ou segunda metade) e número de gestações foram coletados no arquivo de prontuários médicos da Maternidade Marly Sarney. Para a determinação da idade gestacional foram utilizadas: data da última menstruação, altura-uterina e ultra-sonografia.

Análise de dados

Os dados coletados foram agrupados e tabelados. Utilizou-se o programa Excel for Windows® para a confecção de figuras. Os resultados obtidos foram avaliados através do emprego do modelo estatístico qui-quadrado (χ^2), com significância de 95% ($p < 0,05$), através do programa BioEstat® versão 3.0.

RESULTADOS

A análise dos prontuários e dos laudos das 841 gestantes atendidas no período de 2000 a 2004 na Maternidade Marly Sarney revelou que 41 (4,9%) destas apresentaram efeitos citopáticos compatíveis para HPV, enquanto 800 (95,1%) gestantes não apresentaram sinais citológicos para o vírus (Figura 1).

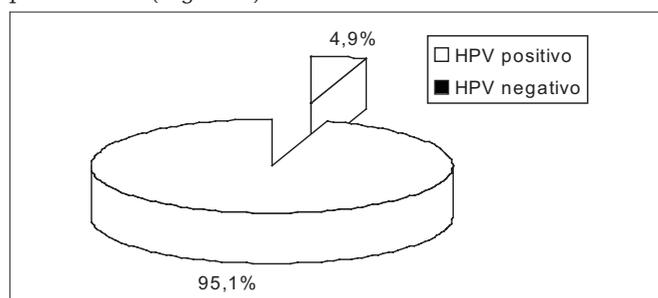


Figura 1. Distribuição das pacientes entre o grupo de gestantes com efeito citopático compatível para HPV e o grupo de gestantes sem efeitos citopáticos compatíveis para HPV (Maternidade Marly Sarney, 2000-2004).

Com relação à idade das gestantes, ficou estabelecido a faixa etária menor que 20 e maior ou igual a 20 anos, conforme descrito na Tabela 1.

TABELA I

Comparação da idade das pacientes entre o grupo de gestantes com efeito citopático compatível para HPV e o grupo de gestantes sem efeitos citopáticos compatíveis para HPV (Maternidade Marly Sarney, 2000-2004).

Idade	HPV positivo		HPV negativo	
	n	%	n	%
< 20	10	24,4	176	22,0
≥ 20	31	75,6	624	78,0
Total	41	100,0	800	100,0

$$p = 0,7191; \chi^2 = 0,1294$$

As gestantes com idade igual ou acima de 20 anos foram prevalentes nos dois grupos estudados, com 75,6 e 78,0%, respectivamente, entre as gestantes com e sem efeito citopático para o HPV. No entanto, não se observou diferença estatisticamente significativa quando avaliada a distribuição de efeito pelo vírus entre os dois grupos etários.

Na Tabela 2 está ilustrada a distribuição da presença ou ausência dos efeitos citopáticos para HPV de acordo com a idade gestacional.

A maioria das gestantes atendidas na Maternidade Marly Sarney durante o período do estudo estava com 20 semanas ou menos de gestação; todavia, apesar do elevado per-

centual observado da presença de efeito citopático para o HPV com menos de 20 semanas (75,6%), não se observou diferença estatística quando comparado com o grupo de gestantes sem efeito citopático (80,9%).

TABELA II

Comparação da idade gestacional entre o grupo de gestantes com efeito citopático compatível para HPV e o grupo de gestantes sem efeitos citopático compatível para HPV (Maternidade Marly Sarney, 2000-2004).

Idade gestacional (semanas)	HPV positivo		HPV negativo	
	n	%	n	%
≤ 20	31	75,6	647	80,9
> 20	10	24,4	153	19,1
Total	41	100,0	800	100,0

p = 0,4055; $\chi^2 = 0,6920$

A Tabela 3 relaciona os achados de efeito citopático para HPV com o número de gestações.

Em relação ao número de gestações, verificou-se diminuição na prevalência de gestantes com efeito citopático para HPV com o aumento da paridade sem, contudo, diferir estatisticamente quando relacionado com o grupo sem efeito citopático.

TABELA III

Comparação entre o número de gestações no grupo de gestantes com efeito citopático compatível para HPV e o grupo de gestantes sem efeitos citopático compatível para HPV (Maternidade Marly Sarney, 2000-2004).

Nº de gestações	HPV positivo		HPV negativo	
	n	%	n	%
< 3	35	85,4	600	75,0
≥ 3	6	14,3	200	25,0
Total	41	100,0	800	100,0

p = 0,1323; $\chi^2 = 2,2659$

Na Tabela 4 estão listados os agentes microbianos freqüentemente encontrados nas amostras analisadas.

Gardnerella vaginalis foi o agente que apresentou maior prevalência, tanto no grupo das gestantes com efeito citopático compatível para HPV (26,8%) quanto nas gestantes sem efeito citopático compatível para HPV (28,0%).

Relacionando-se somente os agentes de importância encontrados na microbiota vaginal (Figura 2), verificou-se que para *Trichomonas vaginalis* e *Candida sp.* existiu diferença quando da gestante com a presença ou ausência de efeito citopático para HPV.

TABELA IV

Comparação dos achados microbiológicos entre o grupo de gestantes com efeito citopático compatível para HPV e o grupo de gestantes sem efeitos citopático compatível para HPV (Maternidade Marly Sarney, 2000-2004).

Achados microbiológicos	HPV positivo		HPV negativo	
	n	%	n	%
<i>Trichomonas vaginalis</i>	2	4,9	12	1,5
<i>Candida sp.</i>	4	9,8	141	17,6
<i>Gardnerella vaginalis</i>	11	26,8	224	28,0
Outros*	24	58,5	423	52,9
Total	41	100,0	800	100,0

*Outros: lactobacilos, bacilos, cocos.

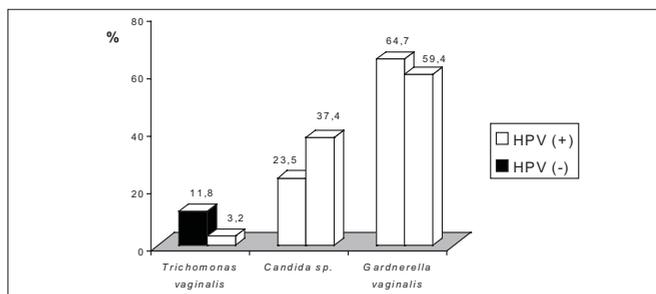


Figura 2. Correlação de *Trichomonas vaginalis*, *Candida sp.* e *Gardnerella vaginalis* em gestantes com efeito citopático para HPV e sem efeito citopático para HPV (Maternidade Marly Sarney, 2000-2004).

Nas Tabelas 5 e 6 estão ilustradas as distribuições de *Gardnerella vaginalis* de acordo com a idade gestacional e sua relação com gestantes com e sem efeito citopático para HPV. Verificou-se que existiu significativa diferença (p=0,0008) na distribuição de *Gardnerella vaginalis* quando avaliada a presença desta bactéria em gestantes com mais de 20 semanas de gestação e com efeito citopático compatível para HPV.

TABELA V

Comparação dos achados de *Gardnerella vaginalis* no grupo de gestantes com efeito citopático compatível para HPV e o grupo de gestantes sem efeito citopático compatível para HPV em gestantes com 20 semanas ou menos de gestação (Maternidade Marly Sarney, 2000-2004).

<i>Gardnerella vaginalis</i>	HPV positivo		HPV negativo	
	n	%	N	%
Presente	5	20,0	49	34,5
Ausente	20	80,0	93	65,5
Total	25	100,0	142	100,0

p = 0,1527; $\chi^2 = 2,044$

TABELA VI

Comparação dos achados de *Gardnerella vaginalis* no grupo de gestantes com efeito citopático compatível para HPV e o grupo de gestantes sem efeito citopático compatível para HPV em gestantes com mais de 20 semanas de gestação (Maternidade Marly Sarney, 2000-2004).

<i>Gardnerella vaginalis</i>	HPV positivo		HPV negativo	
	n	%	n	%
Presente	6	37,5	6	7,3
Ausente	10	62,5	76	92,7
Total	16	100,0	82	100,0

p = 0,0008; $\chi^2 = 11,3502$

DISCUSSÃO

Pelos resultados descritos, observou-se uma maior prevalência de sinais citológicos causados pela infecção por HPV nas gestantes com 20 anos ou mais. Todavia, não se encontrou diferença estatística significativa (p=0,7191) nos dois grupos etários. A literatura tem registrado alta prevalência de infecção por HPV em pacientes jovens, devido possivelmente à exposição precoce da zona de transformação a agentes sexualmente transmissíveis associada a condições locais como ectopia e processos inflamatórios, propiciando o primeiro contato com o HPV e possível evolução subsequente para a neoplasia do trato genital inferior¹.

A idade é um fator importante na prevalência de infecção pelo HPV nas pacientes jovens não grávidas e nas grávidas¹⁰. A gravidez é um fator predisponente à infecção por HPV, devido em parte à diminuição da imunidade celular e modificação dos hormônios esteróides, fato comprovado clinicamente pela alta taxa de regressão das lesões após o parto^{1, 16, 24}. Entretanto discordam dos resultados de Murta *et al.*¹¹ que não observaram um aumento dessa frequência em adolescentes gestantes, sugerindo que a gravidez não seja um fator predisponente para a infecção pelo HPV na faixa etária estudada.

Em relação à idade gestacional, permanece muita discordância sobre o período no qual a infecção por HPV seria mais prevalente. No entanto, a incidência parece ser maior na segunda metade em relação a primeira metade de acordo com os resultados de estudos de alguns autores que mostraram ser mais frequentes os sinais de infecção pelo HPV na segunda metade da gestação, confirmados através de estudos clínicos, citológicos e de hibridização do DNA do HPV^{10, 11}.

Morrison *et al.*⁹ demonstraram que a infecção é mais frequente após 12 semanas de gestação. Chang-Claude *et al.*², estudando 108 gestantes com uso de hibridização do DNA-HPV, encontraram positividade para DNA-HPV em 4 (7,7%) de 52 gestantes no primeiro trimestre, em 2 (2%) de 101 no segundo trimestre, em 7 (5,8%) de 121 no terceiro trimestre, observando um pequeno decréscimo na detecção do HPV do primeiro para o terceiro trimestre.

Nossos resultados concordam com aqueles apresentados por Chang-Claude *et al.*², e discordam com os de Morrison *et al.*⁹, mostrando que os sinais citológicos de infecção pelo HPV foram mais prevalentes nas gestantes que estavam na primeira metade da gestação (75,6% versus 24,4%). Entretanto não se encontrou diferença estatística significativa ($p=0,4055$) nos dois grupos estudados. Todavia, é necessário ressaltar que há uma maior expressão clínica e subclínica da infecção com o evoluir da gravidez devido a uma diminuição do sistema de defesa imunológico por causa dos altos níveis de estrógenos e progesterona que podem interferir no sistema regulatório da replicação viral^{10, 19}.

Outros autores também não encontraram diferença em relação ao período da gestação em que seria mais prevalente a infecção por HPV. Estudo envolvendo 93 gestantes com sinais citológicos de infecção por HPV não relatou diferença estatística na prevalência de alterações citomorfológicas de infecção pelo HPV na citologia entre a primeira e a segunda metade da gestação¹⁰.

Em relação ao número de gestações, nossos resultados mostraram uma diminuição da prevalência da infecção pelo HPV com a maior paridade, estando de acordo com dados descritos na literatura^{9, 10, 11}. No entanto, divergem dos descritos por Gopalkrishina *et al.*⁶, que demonstraram uma maior prevalência na infecção pelo vírus com o aumento do número de gravidez (na Índia) e justificaram pelo início precoce da vida reprodutiva, pela multiparidade com curto intervalo entre os partos. Isto, segundo os autores, poderia facilitar a replicação do vírus com maior frequência e, conseqüentemente, perpetuar a infecção.

A presença de co-infecções genital, transmitida sexualmente ou não, pode ser de importância para o aparecimento dos condilomas genitais, devido provavelmente a um aumento da umidade e da secreção vaginal. Como a infecção genital pelo Papilomavírus é uma doença de transmissão sexual, interage de alguma maneira com as demais afecções que apresentam a mesma via de transmissão, porém esta interação ainda é assunto em pesquisa, com escassez de trabalhos conclusivos^{4, 11}.

A literatura mostra que a gestação gera um desequilíbrio na microbiota vaginal, favorecendo o desenvolvimento tanto do HPV quanto de outros agentes infecciosos. Luceña *et al.*⁸, estudando secreções vaginais de mulheres grávidas, observaram uma prevalência de 41,8% de infecção por fungos. Outro estudo mostrou que 34,2% e 14,7% das mulheres do grupo controle apresentaram *Candida sp.* e *Gardnerella vaginalis*, respectivamente, nos exames citológicos, ao passo que no grupo adolescente com HPV, a porcentagem foi de 15,6 e 22,4%¹². Murta *et al.*¹¹, baseados na presença de *Gardnerella vaginalis* em exames citológicos de grávidas, mostraram uma prevalência de 12,4% nas mulheres sem infecção por HPV contra 21,6% das que apresentaram infecção por HPV, ressaltando que o achado de *Gardnerella vaginalis* é mais prevalente nas gestantes com infecção pelo HPV na segunda metade da gestação.

Relacionando-se somente os agentes de importância encontrados na microbiota vaginal (Figura 2), verificou-se não existir diferença quando da gestante com a presença ou ausência de efeito citopático para HPV infestada por *Gardnerella vaginalis*. Observou-se, no entanto, significativo aumento de *Trichomonas vaginalis* em gestantes com efeito citopático para HPV e, por outro lado, significativa redução de *Candida sp.* nessas gestantes. Dentre os agentes microbiológicos de importância comumente encontrados, *Gardnerella vaginalis* foi o que apresentou maior prevalência, tanto no grupo das gestantes com efeito citopático para HPV (26,8%) quanto no grupo sem efeito citopático para HPV (28,0%), sendo que quando avaliada a presença desta bactéria em gestantes com mais de 20 semanas de gestação e com efeito citopático compatível para HPV, verificou-se que existe significativa diferença ($p=0,0008$).

Estes dados merecem investigação para a melhor compreensão da fisiopatologia da infecção por HPV, pois se há uma interação sinérgica entre a infecção pelo HPV e a presença de *Gardnerella vaginalis* só poderá ser estabelecida através de novas pesquisas^{11, 12, 23}.

Deseja-se ressaltar que os achados microbiológicos foram baseados no método de Papanicolaou que, além de ser utilizado na triagem para a detecção do câncer cervical, tem sido utilizado para o diagnóstico de doenças sexualmente transmissíveis, apresentando conforme resultados de alguns autores, uma elevada especificidade e uma limitada sensibilidade como método de triagem para a detecção de algumas infecções na população feminina, sendo necessária a utilização de testes diagnósticos mais sensíveis como cultura e biologia molecular para ratificar os resultados apresentados na literatura.

Dessa forma, o esfregaço cérvico-vaginal vem sendo utilizado como um instrumento que identifica mulheres propensas a doença pré-maligna e com alto risco para câncer cervical; no entanto, tem-se mostrado eficiente não somente na prevenção, mas também no diagnóstico do HPV, já que estudos evidenciaram tipos específicos na gênese de neoplasia genital.

Neste trabalho realizado com gestantes, a maioria das variáveis se mostrou associada à infecção genital pelo HPV, estando em acordo com achados de outros estudos da literatura já mencionados; porém ainda há uma escassez de informações sobre a história obstétrica e a infecção pelo HPV, merecendo, portanto, aprofundamento dos profissionais da área no presente tema.

REFERÊNCIAS

1. BELDA Jr, W. Doenças sexualmente transmissíveis. São Paulo: Atheneu, 1999.
2. CHANG-CLAUDE, J.; SCHNEIDER, A.; SMITH, E. et al. Longitudinal study of the effects of pregnancy and other factor on detection of HPV. *Gynecologic Oncology*, 60: 355-362, 1996.
3. CORRÊA, M.D. Noções práticas de obstetrícia. 12ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999.
4. I Consenso Brasileiro de HPV (Papilomavirus humano). São Paulo: BG Cultura, 2000.
5. FIFE, K.H.; KATZ, B.P.; ROUSH, J. et al. Cancer associated human papillomavirus types are selectively increased in the cervix of women in the first trimester of pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 174: 1487-1493, 1996.
6. GOPALKRISHNA, V.; MURTHY, N.S.; SHARMA, J.K. et al. Increased human papillomavirus infection with the increasing number of pregnancies in Indian women. *Journal of Infectious Diseases*, 75: 75-78, 1995.
7. JORDÃO, A.V.; RUGGER, L. S.; CHIUCHETA, G.I.R. et al. Importancia da aplicação de critérios morfológicos não clássicos para o diagnóstico citológico de papilomavirus humano. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 3(1): 81-89, 2003.
8. LUCENA, A.L.M.; BARBOSA, R.C.C. Incidência de *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* e fungos, em secreções vaginais de mulheres grávidas. *NewsLab*, n. 44, p. 208-214, 1999.
9. MORRISON, E.A. B; GAMMON, M.D; GOLDBERG, G.L. et al. Pregnancy and cervical infection with human papillomaviruses. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 54: 125-130, 1996.
10. MURTA, E.F.C; SOUZA, M.A.H.; ADAD, S.J. et al. Influência da idade materna, do período gestacional e do número de gestações na infecção pelo papilomavirus humano. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 20(1): 33-35, 1998.
11. MURTA, E.F.C; SOUZA, M.A.H.; ADAD, S.J. et al. Infecção pelo papilomavirus humano durante a gravidez: relação com achados citológicos. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 23(6): 377-381, 2001.
12. MURTA, E.F.C; SOUZA, M.A.H.; ADAD, S.J. et al. Infecção pelo papilomavirus humano em adolescentes: relação com o método anticoncepcional, gravidez, fumo e achados citológicos. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 23(4):217-221,2001.
13. NONNENMACHER, B.; BREITENBACH, V.; VILLA, L.L. et al. Identificação do papilomavirus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Revista de Saúde Pública*, 36(3): 95-100, 2002.
14. NORONHA, V.; MELO, W; VILA, L. et al. Papilomavirus humano associado a lesões de cérvix uterina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(3): 235-240, 1999.
15. Papilomavirus humano e câncer do colo do útero. Disponível: <http://www.vi-rushpv.com.br/diagnostico.asp>. [Capturado em 17 de janeiro de 2004].
16. PINTO, A P; TÚLIO, S.; CRUZ, O.R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 48(1): 73-78, 2002.
17. PISANI, P.; PARKIN, D.M.; BRAY, F. et al. Estimates of the Worldwide Mortality from 25 cancers in 1990. *International Journal of Cancer*, 83: 18-29, 1999.
18. PISANI, P.; BRAY, F.; PARKIN, D.M. Estimates of the Worldwide prevalence of cancer of 25 sites in the adult population. *International Journal of Cancer*, 97: 72-81, 2002.
19. RUSSOMANO, F.A. infecção pelo hpv. Disponível: <http://www.igb.com.br/medhojemulher/pags/fabiorussomano.htm>. [Capturado em 17 de janeiro de 2004]
20. SCHNEIDER, A; MEINHARDT, G.; DE-VILLIERS, EM. et al. Sensitivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hybridization studies. *Diagnostic Cytopathology*, 3: 250-255, 1987.
21. SILVA FILHO, A .M.; LONGATTO FILHO, Colo uterino e vagina: processos inflamatórios. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
22. SILVA, E.D.C.; SMANIOTO, R.; CAMPOS, S.F. et al. Papilomavirus humano. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 36(3): 137-142, 2004.
23. TENTI, P.; ZAPPATORE, N.; MIGLIORA, P. et al. Perinatal transmission of human papillomavirus from gravidas with latent infections. *Obstetrics and Gynecology*, 93(4): 475-479, 1999.
24. YOST, N.P.; SANTOSO, J.; MCINTIRE, D.D. et al. Postpartum regression rates of antepartum cervical intraepithelial Neoplasia II and III lesions. *Obstetrics and Gynecology*, 93(3): 359-362, 1999.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Luiz Mario da Silva Silveira

Dep. Farmácia UFMA

Rua 02 Qd 05 C 05, Residencial Itaguará II, Cohatrac

CEP: 65050-100 S. Luís - MA

PRÊMIO HOTSOFT INFORMÁTICA

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O "Prêmio Hotsoft Informática" - é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, com o patrocínio da Hotsoft Informática Ltda;
- 2) O Prêmio será no valor de R\$ 3.000,00, além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC, nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas.

II - DOS OBJETIVOS

- O "Prêmio Hotsoft Informática" tem por objetivos;
- 1) Estimular o desenvolvimento de soluções que atendam às necessidades dos Laboratórios de Análises Clínicas em qualquer de suas especialidades na área de informática; e
 - 2) Premiar o melhor Programa (Software) inscrito e apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os Programas (Softwares) inscritos e apresentados no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio Hotsoft Informática, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias do programa original completo em disquete ou CD, com o seu respectivo manual de utilização;
- 3) Os Programas concorrentes deverão ser originais no país e no estrangeiro, não publicados ou comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade, e nem tão pouco já comercializados;
- 4) O Programa premiado será obrigatoriamente divulgado na íntegra, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais Programas selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio, poderão ser divulgados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o programa e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será escolhida antecipadamente e publicada no programa oficial do Congresso;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores Programas apresentados, outorgando a um deles o Prêmio Hotsoft Informática, e aos outros 02 (dois) será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A Comissão Julgadora anunciará a sua decisão final após avaliar todos os Programas apresentados;
- 5) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio é indivisível e será conferido a apenas um programa, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Programa concorrente ao prêmio, obrigatoriamente, deve ser apresentado na sessão de Temas Livres por um dos autores do Programa regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) A Hotsoft manterá seção permanente em seu site na internet para divulgar o resumo dos trabalhos inscritos e uma versão demonstrativa dos programas vencedores nas diversas edições do Prêmio;
- 5) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio Hotsoft Informática

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • 20270-902 • Rio de Janeiro • RJ

O Exame do Sêmen na Infertilidade Masculina: V- Exame Microbiológico

The microbiological examination of the sêmen to evaluate male infertility

Fernando Tadeu Andrade-Rocha

RESUMO - Neste artigo, o autor revisa o papel do exame microbiológico do sêmen para avaliar infertilidade masculina. São descritos os efeitos negativos de bactérias aeróbicas e anaeróbicas, micoplasmas, fungos, *Trichomonas sp.*, *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis* e *Mobiluncus sp.* na qualidade do sêmen. A influência de leucocitosp.ermia e bacteriospermia também é revisada. Simultaneamente, também são feitas algumas considerações sobre metodologias atualmente usadas para investigar estes microrganismos no sêmen.

PALAVRAS-CHAVE - Sêmen; infertilidade; microbiologia; cultura; anaeróbios; micoplasmas; *Chlamydia trachomatis*; leucocitosp.ermia; bacteriospermia.

SUMMARY - In this article, the author reviews the role of the microbiological examination of the semen to evaluate male infertility. They are described negative effects of aerobic and anaerobic bacteria, mycoplasmas, fungi, *Trichomonas sp.*, *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis* and *Mobiluncus sp.* on the semen quality. Influence of leukocytosp.ermia, and bacteriosp.ermia are also reviewed. Simultaneously, they are also made some considerations about methodologies currently used to investigate these microorganisms on semen.

KEYWORDS - semen; infertility; microbiology; culture; anaerobes; mycoplasmas; *Chlamydia trachomatis*; leukocytosp.ermia; bacteriosp.ermia.

INTRODUÇÃO

Infertilidade masculina é um distúrbio que afeta um grande número de indivíduos em todo o mundo e, com frequência, o laboratório de análises clínicas é requisitado por especialistas, para auxiliar na sua investigação. O exame do sêmen (espermograma) é o principal exame solicitado nesta investigação.

Em publicações prévias sobre o assunto, (2,3,5,6,7,8) este autor abordou diversos aspectos clínicos e laboratoriais do espermograma, na investigação de infertilidade masculina. Foram revisadas as metodologias usadas no exame, a interpretação dos resultados e sua importância para o diagnóstico. No presente trabalho, o objetivo é continuar esta abordagem, dando ênfase ao exame microbiológico do sêmen. O autor faz várias considerações sobre microrganismos detectados no sêmen, sua relação com processos infecciosos e sua influência na capacidade reprodutiva do homem. O autor também faz algumas considerações sobre metodologias empregadas nesta análise.

CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

Para a análise microbiológica do sêmen, três fatores são básicos para se obter resultados satisfatórios e de valor clínico: 1- a sintomatologia do paciente; 2- a presença de bactérias no sêmen (bacteriospermia); 3- o aumento de leucócitos no sêmen (leucocitosp.ermia). Considerando que, na prática laboratorial, poucos pacientes procuram o laboratório com uma sintomatologia bem definida de infecção genital, os processos infecciosos detectados no exame do sêmen, geralmente são de pacientes que se submetem a um exame de rotina, principalmente, para investigação de infertilidade masculina, ou seja, são assintomáticos. Neste caso, o exame detecta leucocitosp.ermia, que não é, a princípio, indicativa de infecção genital, como se explica adiante. Em contraste, muitas vezes o exame não apresenta bacteriospermia, (cuja pesquisa não é efetuada de rotina na maioria dos laboratórios), o que dificulta o diagnóstico.

Desta forma, é muito difícil caracterizar uma associação entre sintomatologia, leucocitosp.ermia e bacteriospermia, quando o paciente faz um espermograma e são vários os motivos, como segue:

1. Diversos microrganismos colonizam a uretra masculina em condições normais, sem causar infecções. São considerados contaminantes (22,63).
 2. Às vezes, algumas bactérias residentes na uretra se proliferam em quantidade, tornando-se potencialmente patogênicas. Neste caso, desenvolvem infecção temporária (69).
 3. Em muitos exames, a bacteriospermia é intensa, mas não se associa com uma sintomatologia definida ou com leucocitosp.ermia (71).
 4. Alguns pacientes são assintomáticos, mas o exame detecta uma leucocitosp.ermia acentuada. Este quadro é conhecido como infecção silenciosa (64).
 5. Às vezes, o paciente apresenta sintomas, com ou sem leucocitosp.ermia e/ou bacteriospermia. Isso acontece com alguns tipos de prostatites (36).
 6. Alguns exames apresentam uma elevada proliferação de bactérias anaeróbicas, que são potencialmente patogênicas e podem desenvolver um processo infeccioso (27). Geralmente, as infecções causadas por estas bactérias não são investigadas clinicamente, ou na rotina microbiológica do sêmen.
 7. O plasma seminal contém várias substâncias com propriedades antimicrobianas, que funcionam como uma barreira à proliferação bacteriana (37).
 8. Também se observa com frequência alterações em marcadores da próstata e das vesículas seminais (21). Entretanto, estas alterações são desconsideradas clinicamente, embora possam ajudar na localização do sítio da infecção. Ressalta-se que muitos laboratórios não pesquisam marcadores bioquímicos glandulares de rotina, apesar de serem úteis para o diagnóstico (10).
- Como se observa, dificilmente se caracteriza uma associação bem definida entre sintomatologia, leucocitosp.ermia e bacteriosp.ermia na maioria dos exames, o que muitas vezes dificulta o diagnóstico.

Recebido em 06/12/2006

Aprovado em 26/12/2007

Laboratório Dr. Homero Soares Ramos, Unidade de Pesquisa do Sêmen, Petrópolis, RJ
Laboratório Dr. Ivan Mostaro, Juiz de Fora, MG

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MICRORGANISMOS DETECTADOS NO SÊMEN

O isolamento de bactérias e outros microrganismos no sêmen variam entre 10 e 100% das amostras analisadas, dependendo da população estudada (61). A prevalência das espécies também é variável, pois há vários fatores que afetam o isolamento destes microrganismos, como segue:

- As populações avaliadas em estudos prévios foram heterogêneas (homens férteis, inférteis, com uretrite, prostatite, etc.) e os resultados bem variados (46);
- Vários estudos não usaram procedimentos, para evitar a contaminação do sêmen pela flora bacteriana uretral durante a colheita, o que aumenta a frequência bacteriana da amostra analisada (14);
- As investigações reportadas previamente, de um modo geral, não pesquisaram todos os microrganismos que podem ser detectados no sêmen.

Desta forma, praticamente não há uma informação bem definida, sobre a prevalência de microrganismos no sêmen e seu papel etiológico em infecções genitais. São apenas informações isoladas, muitas vezes conflitantes e, geralmente, de pouco valor clínico. Consultando as informações disponíveis, resume-se, que os seguintes microrganismos podem ser detectados no sêmen (veja Tabela I):

TABELA I

Microrganismos comensais e potencialmente patogênicos que podem ser detectados no sêmen

Bactérias aeróbicas	Bactérias anaeróbicas e facultativas	Fungos	Outros microrganismos
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Peptococcus sp.</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Streptococcus epidermidis</i>	<i>Peptostreptococcus sp.</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Torulopsis glabrata</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Eubacterium sp.</i>	<i>Rhodotorula sp.</i>	<i>Trichomonas sp.</i>
<i>Enterobacteriaceae sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>		
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Propionibacterium sp.</i>		
	<i>Bacillus sp.</i>		
	<i>Clostridium sp.</i>		
	<i>Neisseria sp.</i>		
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		
	<i>Veillonella sp.</i>		
	<i>Acinetobacter s.p</i>		
	<i>Actinomyces sp.</i>		
	<i>Bacteroides sp.</i>		
	<i>Fusobacterium sp.</i>		
	<i>Gardnerella sp.</i>		
	<i>Mobiluncus sp.</i>		

Bactérias aeróbicas gram positivas

São as bactérias mais comuns, predominando os cocos gram positivos (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) (71). Em pacientes assintomáticos, a colonização destas bactérias ocorre na glândula, uretra proximal e uretra distal (22,81,98). O isolamento varia entre 10% e 100% das amostras e geralmente ocorre em baixas concentrações (<10⁴ unidades formadoras de colônias/ml – ufc/ml). Estas características indicam, que são bactérias residentes da uretra e podem ser carregadas pelo sêmen durante a ejaculação. Portanto, seu isolamento no líquido seminal não é indicativo de infecção genital e ocorre com frequência em homens assintomáticos. Por outro lado, o isolamento em concentrações >10⁴ ufc/ml é raro e sugestivo de infecção genital.

Bactérias aeróbicas gram negativas

Sua frequência é menor que 10% (46) e raramente são isoladas em homens assintomáticos. Portanto, sua presença no sêmen é sugestiva de infecção genital. *Escherichia coli* é a bactéria mais comum, mas são também detectados *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.* e raramente a *Pseudomonas sp.*. Estas bactérias geralmente afetam a motilidade espermática (40).

Bactérias anaeróbicas

A presença de bactérias anaeróbicas no sêmen é conhecida há muito tempo, mas, pouca atenção é dada a seu isolamento e sua etiologia em infecções genitais. Rotineiramente isolam-se *Peptococcus sp.* e *Peptostreptococcus sp.*, *Eubacterium sp.*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium sp.* e com menor frequência *Corynebacterium sp.* (27,43). Este isolamento ocorre em indivíduos assintomáticos (98), com uretrite, prostatite, prostato-vesiculites e balanitis (74). De um modo geral, as bactérias anaeróbicas são habitantes naturais da uretra, mas são potencialmente patogênicas. Desta forma, em algumas circunstâncias desenvolvem um processo infeccioso, geralmente de natureza polimicrobiana. Assim é comum o isolamento de diferentes bactérias anaeróbicas (às vezes 5 ou mais bactérias) na mesma amostra seminal.

No trato genital feminino é bem definida, a associação destas bactérias com infecções ginecológicas e obstétricas graves, vaginite e vaginose bacteriana (15,53,54). Contrastando com seu alto poder infectante, estes microrganismos também são isolados em mulheres normais (54).

Além das espécies citadas acima, também se isolam de rotina no exame microbiológico do sêmen *Lactobacillus sp.*, *Veillonella sp.*, *Propionibacterium sp.* e *Bifidobacterium sp.*. Por outro lado, raramente são isoladas *Actinomyces sp.* e *Clostridium sp.*, *Neisseria sp.* (incluindo a *Neisseria gonorrhoeae*) e algumas bactérias não convencionais tais como *Rubrivivax sp.*, *Burkholderia sp.* e *Streptococcus pneumoniae* (43). Ressalta-se que, em um estudo anterior (42), observou-se a aderência de bactérias anaeróbicas em células do epitélio uretral presentes no ejaculado. Desta forma, suspeita-se que o sêmen pode ser um veículo de transmissão destes microrganismos para o trato genital feminino, causando a vaginose bacteriana. Tal característica também foi observada por este autor previamente (2).

Micoplasmas

Micoplasmas são microrganismos da classe Mollicutes, que abrange mais de 120 espécies, das quais, seis colonizam o trato genital masculino (84). Destas, três são considerados clinicamente importantes: *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* e *Ureaplasma urealyticum*. Estas espécies são potencialmente patogênicas e atuam como agentes etiológicos de infecções genitais, inclusive no trato genital feminino.

Micoplasmas são conhecidos desde o século 19 (65), mas o primeiro isolamento em seres humanos somente foi reportado em 1937, por Dienes & Edsall (25), que detectaram um microrganismo com características sugestivas de *Mycoplasma hominis* em uma mulher com abscesso na glândula de Bartholin. Esta espécie somente foi definitivamente identificada nos anos 50, ao passo que o *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma genitalium* foram descobertos nas décadas de 50 e 80, respectivamente.

Resume-se a importância clínica das espécies de micoplasmas no trato genital masculino como segue:

Mycoplasmas hominis – No homem é descrito como comensal, por ser frequentemente isolado em indivíduos assinto-

máticos (84). Porém, também é um agente etiológico de uretrite não gonocócica, balanopostites e prostatites e de vaginose bacteriana, doença inflamatória pélvica, septicemia pós-parto, ruptura de membranas e corioamnionites em mulheres (87). Partos prematuros e problemas neonatais também são comuns, quando a mãe é portadora deste microrganismo (12,35). Recentes evidências também indicam que o *Mycoplasma hominis* pode se fixar e penetrar nos espermatozoides, afetando a capacidade de fertilização (23).

Mycoplasma genitalium – Este microrganismo foi isolado pela primeira vez na década de 80 (89), mas sua ação como patógeno genital é pouco conhecida, por ser difícil seu isolamento através de cultura. Sabe-se que o *Mycoplasma genitalium* causa uretrite não gonocócica e *Chlamydia trachomatis* negativa, aguda e provavelmente crônica (85), supostamente tão frequente quanto às uretrites por *Chlamydia trachomatis* e caracterizada por uma forte resposta inflamatória. Também é isolado em uretrites recorrentes resistentes a tratamento (41) e em homens assintomáticos (prevalência de 0,8% a 9,1%) (104). Apesar de sua presença na uretra, raramente é detectado no sêmen (menos de 1% das amostras), embora se suspeita que se envolva com epididimites e prostatites aguda e crônica (72). Na mulher, foi observada sua associação com uretrites, cervicites (inclusive mucopurulenta), endometrite, e salpingites (86). Em contraste com o *Mycoplasma hominis*, raramente é detectado em mulheres com vaginose bacteriana (59). *Mycoplasma genitalium* também pode se fixar nos espermatozoides e serem transmitidos para o trato genital feminino (83), provavelmente prejudicando a fertilização.

Ureaplasma urealyticum – É o menor microrganismo vivo conhecido. Sua prevalência no trato genital masculino varia entre 30 e 85% (82) e seu isolamento no sêmen, entre 7% e 42% (61). Há 14 sorotipos de *Ureaplasma urealyticum* conhecidos, classificados por análise filogenética em 2 biovars, o biovar 1 ou Parvum Biovar que abrange os sorotipos 1,3,6 e 14 e o biovar 2, ou biovar T960, que inclui os demais (70). Evidências mais recentes indicam que estes biovars seriam 2 espécies distintas, o *Ureaplasma parvum* (Biovar 1) e o *Ureaplasma urealyticum* (Biovar 2) (48). Suspeita-se, que alguns sorotipos se associam com doenças, enquanto que outros não apresentam esta característica. Pelo fato de ser desprovido de membrana celular e de reduzido tamanho, o *Ureaplasma urealyticum* se adere facilmente aos espermatozoides, particularmente na peça intermediária e no flagelo. Esta aderência promove uma peroxidação lipídica, que reduz a fluidez da membrana espermática, aumentando a quantidade de radicais livres no sêmen (estresse oxidativo) (68) e provoca um enrolamento do flagelo ("coil tail") (66). Estes distúrbios prejudicam a motilidade espermática e a capacidade de fertilização. Às vezes, o *Ureaplasma urealyticum* também induz à formação de anticorpos antiespermatozoides (79), apoptose (morte celular programada) anormal e fragmentação do DNA (102), afetando o desenvolvimento do embrião, após a fertilização. Por causa destes efeitos, constantemente se associa o *Ureaplasma urealyticum* com infertilidade masculina, embora não haja um consenso sobre esta associação.

São muitas as dificuldades para estabelecer a patogenicidade do *Ureaplasma urealyticum*, a qual pode estar vinculada a determinados sorotipos, mas poucos avanços foram obtidos nesta área. Na prática clínica, relatos demonstraram que o *Ureaplasma urealyticum* causa epididimites, prostatites (cuja prevalência é alta) e uretrite não gonocócica (84). Entretanto, este microrganismo é muito isolado em homens assintomáticos, o que dificulta sua caracteri-

zação como agente etiológico de infecções genitais (82). Curiosamente, parece que o *Ureaplasma urealyticum* não se associa com leucocitospermia, mesmo em pacientes sintomáticos (68). Esta característica também foi observada por este autor em estudos feitos anteriormente, com secreções uretrais (1) e semens (9).

Na mulher foi relatado o envolvimento de *Ureaplasma urealyticum* com infecções genitais, patologias obstétricas, nascimento prematuro e infecções neonatais (44).

Vários métodos são avaliáveis para o diagnóstico laboratorial de micoplasmas usando meios de cultura seletivos e técnicas de biologia molecular (PCR). Como estes microrganismos são extremamente sensíveis a condições adversas, as amostras devem ser inoculadas imediatamente, ou em meios de transporte apropriados (A3b, por exemplo). Para o *Mycoplasma hominis* e o *Ureaplasma urealyticum*, alguns meios líquidos (caldos U10, MLA, B broth) e sólidos (A7) são usados. Técnicas de biologia molecular são recomendadas para detectar *Mycoplasma genitalium*, mas, também podem ser usadas para o *Mycoplasma hominis* e para o *Ureaplasma urealyticum* e o *Ureaplasma parvum* (105).

Chlamydia trachomatis

A *Chlamydia trachomatis* é um significativo agente etiológico de doenças sexualmente transmissíveis, que causa cerca de 90 milhões de novos casos por ano em todo o mundo (30). No Brasil não há dados disponíveis, mas sabe-se que a incidência deste patógeno também é bastante elevada.

Infecções por *Chlamydia trachomatis* desenvolvem-se a partir da fixação de corpos elementares (EB) metabolicamente inertes do patógeno, em células epiteliais da uretra formando uma inclusão (vacúolo). Nesta inclusão, os corpos elementares se diferenciam em corpúsculo reticulado (RB), a forma ativa do patógeno, que prolifera e desenvolve a infecção. Simultaneamente, os corpúsculos reticulados se diferenciam em novos corpos elementares, que se rompem e infectam outras células, reiniciando o ciclo (19). A *Chlamydia trachomatis* causa inflamação aguda na uretra, geralmente caracterizada por corrimento intenso, resultante de uma forte resposta inflamatória, que, de um modo geral, é facilmente tratada com antibióticos.

Por sua capacidade de disseminação dentro do trato genital masculino, a *Chlamydia trachomatis* também pode colonizar a próstata, as vesículas seminais e os epidídimos, onde também desenvolve infecções agudas e crônicas (95). Entretanto, seu papel etiológico em infecções nestes órgãos não é bem definido. Sabe-se apenas que estas infecções às vezes causam oclusões nos ductos excretórios, danos na espermatogênese e respostas imunológicas com a produção de anticorpos antiespermatozoides (31), afetando a capacidade reprodutiva do homem.

A *Chlamydia trachomatis* é facilmente detectada em swabs uretrais e na urina, mas é pouco demonstrável em outras secreções genitais masculinas. Igualmente observou-se, que a presença de anticorpos séricos ou seminais anti-*Chlamydia* não são indicativos de uma infecção corrente, pois também são detectados em homens assintomáticos ou sem uma resposta inflamatória bem definida (56).

Basicamente, há o seguinte consenso sobre o papel etiológico da *Chlamydia trachomatis* em infecções genitais masculinas e sobre sua influência na capacidade reprodutiva do homem (28,31,67,97): 1- O patógeno é bem caracterizado em uretrites e epididimites; 2- Nos epidídimos às vezes provoca uma estenose parcial ou total destes órgãos e dos ductos ejaculatórios, que comprometem dramaticamente a fertilidade masculina. Em alguns casos, resultam em azo-

ospermia; 3- Dependendo da resposta imune ao patógeno, formam-se anticorpos antiespermatozóides, os quais também afetam a fertilidade masculina; 4- Por seu suposto envolvimento com prostatites crônicas, suspeita-se que a *Chlamydia trachomatis* cause diversas anormalidades seminais, tais como hipospermia, baixos níveis de frutose e de marcadores bioquímicos da próstata, edema, dilatação das vesículas seminais, dos ductos ejaculatórios e do plexo venoso periprostático, além de calcificações intraprostáticas. Estas anormalidades afetam a atividade secretora glandular e a qualidade do sêmen. 5- Também há evidências que a *Chlamydia trachomatis* aumenta a apoptose das células germinais imaturas, afetando a produção de espermatozóides. Um lipopolissacarídeo presente em sua estrutura seria o responsável por este fenômeno. 6- Outras evidências indicam que a resposta imune às infecções por *Chlamydia trachomatis* promove peroxidação lipídica da membrana espermática, aumentando a produção de radicais livres, os quais também afetam a fertilidade masculina. 7- Por outro lado, este patógeno pode ser detectado em 70 a 80% de mulheres e 50% de homens assintomáticos, o que também é uma grande preocupação para epidemiologistas, por causa de sua transmissão sexual para parceiros não infectados.

Considerando a importância clínica e epidemiológica da *Chlamydia trachomatis* no trato genital masculino, deve-se enfatizar que este patógeno tem a capacidade de usar os espermatozóides como veículo de transmissão para o trato genital feminino, durante a ejaculação (93). Apesar da travessia da acidez vaginal ser nociva à sua sobrevivência, a *Chlamydia trachomatis* prolifera com facilidade, quando alcança o muco cervical e, por sua capacidade ascendente, também coloniza as partes superiores do trato genital feminino, causando doença inflamatória pélvica, infertilidade, e gravidez tubária (80). Esta é a principal preocupação de especialistas em reprodução humana, em relação à *Chlamydia trachomatis*.

Resumindo, suspeita-se que a *Chlamydia trachomatis* afete a fertilidade masculina, embora isto não seja ainda bem definido. Clinicamente, sua importância para casais inférteis, diz respeito, principalmente, aos danos que este patógeno causa no trato genital feminino. Sua detecção é efetuada por técnicas de cultura celular, imunofluorescência, ensaio imunoenzimático, sendo os métodos por biologia molecular, particularmente os testes por amplificação de ácidos nucleicos, os mais sensíveis para detecção deste patógeno (77).

Fungos

A presença de fungos no sêmen é pouco reportada na literatura, embora estes microrganismos sejam freqüentes, principalmente, no trato genital feminino. De fato, a mulher apresenta uma tendência para adquirir candidíase com facilidade, mas, apesar de sua transmissão sexual, raramente se isola *Candida albicans* no sêmen (incidência menor que 4%) (62), mesmo sendo este microrganismo muito comum em balanopostites (60). A *Candida albicans* é o fungo de maior prevalência, mas outras espécies também são detectadas, tais como a *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida Krusei* (52). O presente autor também já isolou *Rhodotorula sp.* em uma amostra seminal de um paciente infértil (dados não publicados), apesar deste fungo ser predominantemente detectado em semens de animais (26).

A influência de fungos na qualidade do sêmen é pouco conhecida. Há evidências que prejudicam a motilidade espermática (57) e causam fragmentação do DNA e apoptose anormal (16). Estes distúrbios afetam a capacidade de

fertilização, principalmente, em reprodução assistida. Uma vez presente no sêmen, se transmitem sexualmente para a mulher e desenvolvem infecções, também prejudicando sua capacidade reprodutora.

Trichomonas sp.

A presença de *Trichomonas sp.* no trato reprodutor masculino é documentada na literatura, incluindo sua detecção no sêmen. Sua freqüência é estimada em 4%, para homens assintomáticos e até 58%, em pacientes com alto risco para a infecção (33). *Trichomonas sp.* causa orqui-epididimites, prostatites e uretrites, mas sua influência na qualidade do sêmen é pouca conhecida. Há evidências que este microrganismo reduz a motilidade e a vitalidade espermática, o número de espermatozóides morfológicamente normais, o teste hiposmótico e causam hiperviscosidade seminal, (33,49) alterações que comprometem a fertilidade masculina. *Trichomonas sp.* também é detectado em pacientes com prostatites, (51) mas, neste caso, seus efeitos na qualidade do sêmen são praticamente desconhecidos.

Gardnerella vaginalis

Em associação com bactérias anaeróbicas, *Mobiluncus sp.* e micoplasmas, a *Gardnerella vaginalis* causa a vaginose bacteriana, uma infecção genital muito comum na mulher em idade reprodutiva. Além de promover mudanças radicais no pH vaginal, a vaginose bacteriana caracteriza-se por intensa proliferação bacteriana, desaparecimento da flora normal da vagina e pela formação de estruturas celulares conhecidas como células guias ("clue cells"), que são células do epitélio vaginal com membrana citoplasmática revestida de bactérias, as quais, muitas vezes, também ocupam seu citoplasma, promovendo uma intensa destruição celular (78).

No homem, também se demonstrou que a *Gardnerella vaginalis* e outros agentes etiológicos da vaginose bacteriana colonizam a uretra e formam células guias (94) desenvolvendo a infecção e re-infectando a mulher pelo contato sexual. De fato, estudos prévios demonstraram que o sêmen é um veículo de transmissão sexual dos agentes etiológicos da vaginose bacteriana (4,17,42,94),.

Se a vaginose bacteriana é uma infecção genital clinicamente bem definida na mulher, quanto à sintomatologia e agentes etiológicos, há poucas informações na literatura sobre a influência da *Gardnerella vaginalis* na fertilidade masculina. Há relatos que este microrganismo não afeta a qualidade do sêmen (42,47). Entretanto, dados do presente autor sugerem uma influência negativa sobre a motilidade espermática (dados não publicados). Também se suspeita, que a *Gardnerella vaginalis* prejudica a implantação do embrião em reprodução assistida (99). Entretanto, são dados ainda pouco conclusivos.

Mobiluncus sp.

Assim como a *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus sp.* também participam do conglomerado bacteriano responsável pela vaginose bacteriana. Estes microrganismos são bacilos anaeróbicos curvos gram negativos, geralmente isolados no trato genital feminino. Duas espécies são esporadicamente detectadas no sêmen: *M. mullieris* e *M. curtisii* (90). Em pacientes inférteis, o isolamento é inferior a 10% das amostras seminais (39). Porém, praticamente não há informações sobre sua influência na qualidade do sêmen. Por ser um agente etiológico da vaginose bacteriana, supõe-se que também afete negativamente.

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE LEUCOCITOSPERMIA

O aumento de leucócitos no sêmen em valores maiores que $1,0 \times 10^6/\text{ml}$ é uma alteração seminal conhecida como leucocitospermia. Este distúrbio geralmente é sugestivo de infecção genital, embora esta não seja caracterizada em muitas amostras seminais analisadas de rotina. Leucocitospermia, pode se associar com um aumento de bactérias no sêmen (27,71) e com alterações em marcadores bioquímicos da próstata e das vesículas seminais (10,21,32,58), o que ajuda na identificação dos agentes etiológicos e do sítio da infecção, respectivamente.

Apesar da leucocitospermia ser um achado comum no exame do sêmen, sua influência sobre a função espermática é controversa, sendo este um tema de permanente debate há muitas décadas. Isto se demonstra pela grande quantidade de artigos reportados nos últimos 30 anos sobre este assunto. Apesar de tantas abordagens, ainda são pouco conhecidas as causas do aumento de leucócitos no sêmen, seus mecanismos biológicos e em que casos, especificamente, afetariam a função espermática, prejudicando a capacidade reprodutiva do homem. De fato, leucócitos têm um papel importante no sêmen, pois remove espermatozoides anormais ou degenerados. Também produzem radicais livres, que em concentrações normais são essenciais para a fisiologia seminal. Por outro lado, o aumento de leucócitos em níveis superiores àqueles descritos pela OMS pode levar a um estado denominado estresse oxidativo, que se caracteriza por excessiva produção de radicais livres, o quais prejudicam a reação acrossômica (evento essencial para o processo de fertilização) e a integridade do DNA espermático, afetando a capacidade de fertilização (55,76). Leucocitospermia tem várias etiologias: infecções bacterianas (46), infecções virais (50), espermatogênese anormal (13) e fatores diversos tais como cigarro, álcool e drogas de abuso (20). Muitos estudos encontraram uma relação entre leucocitospermia e infertilidade (11,29,75,100,103). Entretanto, outros não foram capazes de fazê-lo (88,96), ao passo que, alguns autores identificaram até um efeito positivo da leucocitospermia no sêmen (45). Outros estudos mostraram que o aumento de leucócitos no sêmen pode se associar com uma produção exagerada de anticorpos antiespermatozoides, de radicais livres e com alterações nos marcadores físico-químicos de próstata e das vesículas seminais, os quais afetam a qualidade do sêmen (55,101). Na verdade, o tema é bastante complexo e abrangente e as informações disponíveis são controversas e pouco conclusivas.

Outro aspecto importante da leucocitospermia diz respeito aos produtos leucocitários. Além dos radicais livres, que são produzidos em excesso na leucocitospermia, níveis aumentados de algumas citocinas (interferon gama, fator alfa necrose tumoral) são detectados no sêmen (18) e também causam efeitos deletérios sobre os espermatozoides, particularmente na motilidade espermática. No entanto, a influência destas substâncias varia em intensidade e depende das subpopulações leucocitárias presentes, da origem do distúrbio e de sua duração. Esta área é ainda pouco pesquisada.

Na rotina de análise do sêmen, a maioria das amostras contém concentrações normais de leucócitos ($<1,0 \times 10^6/\text{ml}$). De um modo geral, granulócitos representam 50 a 60% de todos os leucócitos seminais, macrófagos de 20% a 30% e T-linfócitos de 2% a 5% (88). Células plasmáticas, B-linfócitos e eosinófilos, raramente são encontrados. Ressalta-se, que os métodos usados de rotina para detectar leucócitos no sêmen não são capazes de estimar estas subpopulações

leucocitárias, individualmente. Isto somente é possível com metodologias que usam anticorpos monoclonais (101).

Se a presença de leucócitos no sêmen é um fato bem documentado, mas seus efeitos sobre a qualidade do sêmen não são bem definidos, o valor de referência atualmente recomendado pela OMS, também é um assunto controverso. De fato, alguns estudos mostraram que semens com valores $>1,0 \times 10^6/\text{ml}$ também são encontrados em pacientes férteis (38). Ao mesmo tempo, quando se estudou pacientes inférteis, alguns resultados não estabeleceram uma relação bem definida entre leucocitospermia e infertilidade (88,96). Apontam-se como as principais causas destas distorções, as diferentes metodologias usadas nos estudos efetuados, a origem do infiltrado leucocitário, as subpopulações leucocitárias presentes, os diferentes mecanismos de ativação celular, que variam com a natureza e com as características do processo infeccioso presente e a complexidade dos mecanismos que regulam a produção de radicais livres pelos leucócitos e de antioxidantes seminais. Estes fatores induzem a resultados conflitantes e pouco conclusivos. Como se observa, uma simples contagem de leucócitos no sêmen não é suficiente para avaliar todos os fatores envolvidos na resposta leucocitária e seus efeitos sobre a função espermática. Em adição, experimentos com pacientes submetidos a técnicas de reprodução assistida também mostraram, que os danos sobre os espermatozoides podem ser maiores in vitro do que in vivo (92). Com base estas observações, conclui-se que ainda persistem inúmeras dúvidas sobre os efeitos da leucocitospermia na qualidade do sêmen e sua importância clínica.

INFLUÊNCIA DA BACTERIOSPERMIA NA QUALIDADE DO SÊMEN

A presença de bactérias no sêmen também é um fato bem documentado na literatura, assim como sua influência em características espermáticas e na atividade secretora das glândulas acessórias genitais. Há inúmeros relatos sobre bactérias aeróbicas gram positivas e gram negativas, bactérias anaeróbicas, micoplasmas, *Chlamydia trachomatis*, *Candida sp.* e *Trichomonas sp.* influenciando negativamente na qualidade do sêmen. Estes microrganismos são isolados predominantemente na uretra, mas também são agentes etiológicos de prostatites, vesiculites, prostato-vesiculites, orquites, epididimites e orqui-epididimites, infecções que afetam a fertilidade masculina em muitos casos. De um modo geral, comparações entre homens infectados e não infectados mostraram que a vitalidade e a motilidade são os parâmetros seminais mais afetados (62,73). Em alguns pacientes, a morfologia espermática, a integridade da membrana espermática e a contagem de espermatozoides também podem ser prejudicadas (34,73,91). Quando estes processos infecciosos atingem à próstata e as vesículas seminais, prejudicam a produção de fluidos glandulares, o que também causa um impacto negativo sobre os espermatozoides (24). Ressalta-se, que estes efeitos dependem do tipo de microrganismo presente, do sítio da infecção, da resposta inflamatória ao processo e da concentração bacteriana (valores $\geq 10^4$ unidades formadoras de colônias (ufc)/ml determinam a provável patogenicidade destes microrganismos).

PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Como apresentado nesta revisão, vários microrganismos colonizam o sêmen afetando a qualidade dos fluidos semi-

nais e a função espermática. Apesar de não ser viável a investigação de todos os microrganismos aqui citados, na rotina laboratorial, pela complexidade de algumas metodologias empregadas e de seus altos custos, os quais são inacessíveis para muitos laboratórios, ainda assim é possível estabelecer alguns critérios práticos para investigar bactérias e outros microrganismos no sêmen, como segue:

Através de uma triagem bacterioscópica

Faz-se esta triagem em esfregaços seminais corados pelo Gram, que detecta as seguintes estruturas bacterianas:

- **Cocos gram positivos** – são indicativos de bactérias aeróbicas (*Staphylococcus sp.* e *Streptococcus sp.*) e anaeróbicas (*Peptococcus sp.* e *Peptostreptococcus sp.*).
- **Bacilos gram positivos** – são bactérias anaeróbicas ou aeróbicas facultativas (*Corynebacterium sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Eubacterium sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Lactobacillus sp.* e *Bacillus sp.*).
- **Bactérias gram negativas** – inclui bactérias aeróbicas (enterobacteriáceas) e anaeróbicas (*Bacteroides sp.* e *Fusobacterium sp.*).
- **Bacilos gram negativos pleomórficos** – são indicativos de *Gardnerella vaginalis*. Às vezes encontram-se aderidos às células do epitélio uretral.
- **Bacilos curvos gram negativos** – São raros e indicativos de *Mobiluncus sp.*. Algumas vezes *Bacteroides sp.* também apresentam esta característica.
- **Cocos gram negativos** – sugestivos de *Veillonella sp.*.
- **Diplococos gram negativos** – sugestivos de *Neisseria sp.* inclusive *Neisseria gonorrhoeae*.
- **Formas de leveduras** – encontrados com frequência na forma de hifas, esporos e conídios, com morfologia bastante variável. São sugestivos de *Candida sp.* e *Rhodotorula sp.*.
- **Trichomonas sp.** – raramente são encontrados.

A frequência destes microrganismos é bastante variável. Na maioria das amostras se detectam raros cocos gram positivos, mas, outras estruturas morfológicas também são encontradas em maior ou menor frequência. Por outro lado, algumas amostras apresentam uma frequência bacteriana elevada e, vários tipos morfológicos acima descritos são facilmente caracterizados pelo exame bacterioscópico. Estas informações são clinicamente relevantes, pois ajudam a caracterizar a bacteriospermia e a influência destes microrganismos na fertilidade masculina em muitos casos. Por isto, devem ser pesquisados e reportados no exame.

Através do isolamento de microrganismos no sêmen

A rotina ideal para o exame microbiológico do sêmen deve abranger a investigação de todos os principais agentes etiológicos citados neste trabalho, adequada à disponibilidade técnica de cada laboratório. A investigação de bactérias aeróbicas gram positivas e gram negativas, *Candida albicans* e micoplasmas é essencial, pois estes microrganismos são os mais comuns na rotina do exame. Outro procedimento importante é a cultura de bactérias anaeróbicas, pois estes microrganismos são tão comuns quanto às bactérias aeróbicas e micoplasmas.

Em muitos exames, isola-se uma flora polimicrobiana constituída de 2 ou mais microrganismos (na rotina deste autor, até 7 tipos diferentes de bactérias foram identificadas em uma única amostra), os quais afetam significativamente a qualidade do sêmen. Estas bactérias são sexualmente transmissíveis, através do coito e causam vaginites e cervicites, também de etiologia polimicrobiana. Apesar de complexa, a cultura de bactérias anaeróbicas pode ser efetuada de rotina em qualquer laboratório, em um sistema de

triagem com meios de cultura específicos (agar sangue, agar chocolate, CDC, etc). Neste sistema de triagem, faz-se o isolamento da colônia, que é posteriormente corada pelo gram para identificar o tipo morfológico presente. Cada bactéria anaeróbica, gram negativa ou gram positiva, tem suas características morfológicas bem definidas, que podem ser facilmente identificadas pelo gram, as quais, na maioria das vezes, identificam o tipo de bactéria presente, de forma presuntiva, ao nível do gênero, por exemplo, *Bacteroides sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, etc. Praticamente, todas as bactérias anaeróbicas podem ser caracterizadas no exame do sêmen através deste sistema de triagem, que pode ser usado em qualquer laboratório. Para identificação bacteriana, testes bioquímicos (Sistema API 20A[®]) também são disponíveis.

Em relação a outros microrganismos tais como a *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis* e *Chlamydia trachomatis*, a investigação deve ser efetuada nos casos mais específicos, nos quais se suspeita da sua presença, pois não são muito frequentes na rotina do exame. *Trichomonas sp.* e *Mobiluncus sp.* são muito raros, mas também podem ser pesquisados de rotina. Micoplasmas também tem procedimentos específicos para identificação como descrito em um tópico específico deste trabalho.

CONCLUSÃO

Infertilidade conjugal é um problema que afeta um número cada vez maior de casais em todo o mundo, o que é motivo de preocupação, na mesma proporção, para especialistas em reprodução humana. Devido à complexidade do problema, que envolve numerosos fatores etiológicos no homem, na mulher e na relação do casal, hoje se buscam cada vez mais alternativas de investigação, de modo a se obter melhores resultados, pois a infertilidade conjugal envolve aspectos pessoais, psicológicos e sociais, que podem afetar a vida de um casal. Como laboratoristas, nossa participação é importante, pois muitos exames fazem parte da rotina de investigação de casais inférteis, tais como dosagens hormonais, o espermograma e o exame microbiológico do sêmen. O espermograma tem um papel decisivo nesta investigação, pois é um exame que pode dar numerosas informações sobre a atividade funcional dos órgãos genitais masculinos e seus distúrbios.

Previamente, este autor reportou neste periódico, a importância da análise de características espermáticas, dos fluidos glandulares, da função espermática (testes funcionais) e da interação espermatozóide-muco cervical (2,3,5,7). Não menos importante é o exame microbiológico do sêmen, aqui abordado, devido à elevada incidência de diferentes microrganismos, no trato reprodutor masculino. Há muitas evidências que estes microrganismos afetam a capacidade reprodutiva do homem e, portanto, devem ser investigados, embora este procedimento não faça ainda parte da rotina básica de investigação do casal infértil. No entanto, um exame microbiológico mais abrangente, como abordado neste trabalho, pode ser efetuada de rotina, pois há muitos profissionais capacitados para executá-lo em nossos laboratórios. Eles podem estabelecer procedimentos padrões viáveis para sua rotina, divulgá-los dentro de sua comunidade e ajudar muitos casais que enfrentam o drama da infertilidade e a pacientes mais velhos, em relação a prostatites, segundo a experiência deste autor, pois a colonização do sêmen por determinados microrganismos é comprovadamente nociva à fertilidade e à saúde masculina.

REFERÊNCIAS

- Andrade-Rocha FT. Isolamento de micoplasmas em uretrite não gonocócica em relação à pesquisa de *Chlamydia trachomatis* e à contagem de leucócitos polimorfonucleares. *J Bras Urol* 19:80-82,1993.
- Andrade-Rocha, FT, Carvalho PPNG. O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina. I- Análise das características espermáticas dos espermatozoides e de suas células precursoras. *Rev Bras Anál Clín* 28:171-178,1996.
- Andrade-Rocha, FT, Carvalho, PPNG. O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina. II- Avaliação da atividade secretora das glândulas acessórias genitais. *Rev Bras Anál Clín* 29:75-80,1997.
- Andrade-Rocha FT. O sêmen como veículo de transmissão sexual dos microrganismos associado à vaginose bacteriana: Relato de caso. *J Bras Ginec* 107:211-216,1997.
- Andrade-Rocha, FT. O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina. III- Testes para função espermática. *Rev Bras Anál Clín* 30:13-21,1998.
- Andrade-Rocha, FT. Sperm parameters in men with suspected infertility. Sperm characteristics, strict criteria sperm morphology analysis and hypoosmotic swelling test. *J Reprod Med* 46:577-582,2001.
- Andrade-Rocha, FT. O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina. IV- Avaliação da interação espermatozoide-muco cervical. *Rev Bras Anál Clín* 34:31-37,2002.
- Andrade-Rocha, FT. Semen analysis in laboratory practice. An overview of routine tests. *J Clin Lab Anal* 17:247-258,2003.
- Andrade-Rocha FT. Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in men attending for routine semen analysis. Prevalence, incidence by age and clinical settings, influence on sperm characteristics, relationship with the leukocyte count and clinical value. *Urol Int* 71:377-381,2003.
- Andrade-Rocha FT. Physical analysis of ejaculate to evaluate the secretory activity of the seminal vesicles and prostate. *Clin Chem Lab Med* 43:1203-1210, 2005.
- Arata de Bellabarba G, Tortolero I, Villarreal V, Molina CZ, Bellabarba C, Velazquez E. Non-sperm cells in human semen and their relationship with semen parameters. *Arch Androl* 45:131-136,2000.
- Aujard Y, Maury L, Doit C, Mariani-Kurkdjian P, Baud O, Farnoux C, Bingen E. Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infections in newborns: personal data and review of the literature. *Arch Pediatr* 12(Suppl.1):S12-18,2005.
- Aziz N, Agarwal A, Lewis-Jones I, Sharma RK, Thomas AJ Jr. Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertil Steril* 82:621-627,2004.
- Boucher P, Lejeune H, Pinatel MC, Gille Y. Spermoculture: improvement of the bacteriological quality of samples by direct verbal counseling before semen collection. *Fertil Steril* 64:657-660,1995.
- Brook I, Frazier EH, Thomas RL. Aerobic and anaerobic microbiologic factors and recovery of beta-lactamase producing bacteria from obstetric and gynecologic infection. *Surg Gynecol Obstet* 172:138-144,1991.
- Burrello N, Calogero AE, Perdichizzi A, Salmeri M, D'Agata R, Vicari E. Inhibition of oocyte fertilization by assisted reproductive techniques and increased sperm DNA fragmentation in the presence of *Candida albicans*: a case report. *Reprod Biomed Online* 8:569-573,2004.
- Catlin BW. Gardnerella vaginalis: characteristics, clinical considerations, and controversies. *Clin Microbiol Rev* 5:213-237,1992.
- Celinska A, Fracki S, Sangidorj D, Barcz E. Role of inflammatory cytokines in male infertility. *Ginekol Pol* 77:404-411,2006.
- Cevenini R, Donati M, Sambri V. Chlamydia trachomatis - the agent. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 16:761-773,2002.
- Close CE, Roberts PL, Berger, RE. Cigarettes, alcohol and marijuana are related to pyospermia in infertile men. *J Urol* 144, 900-903,1990.
- Comhaire FH, Mahmoud AM, Depuydt CE, Zalata AA, Christophe AB. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update* 5:393-398, 1999.
- Cottell E, Harrison RF, McCaffrey M, Walsh T, Mallon E, Barry-Kinsella C. Are seminal fluid microorganisms of significance or merely contaminants? *Fertil Steril* 74:465-470,2000.
- Diaz-Garcia FJ, Herrera-Mendoza AP, Giono-Cerezo S, Guerra-Infante FM. Mycoplasma hominis attaches to and locates intracellularly in human spermatozoa. *Hum Reprod* 21:1591-1598,2006.
- Diemer T, Ludwig M, Huwe P, Hales DB, Weidner W. Influence of urogenital infection on sperm function. *Curr Opin Urol* 10:39-44,2000.
- Dienes L, Edsall G. Observations on the L-Organism of Klieneberger. *Proc Soc Exp Biol Med* 36:740-744,1937.
- Dion WM. The origin and species of yeasts in commercial preparations of bovine semen. *Can J Comp Med* 43:16-21,1979.
- Eggert-Kruse W, Rohr G, Strock W, Pohl S, Schwalbach B, Runnebaum B. Anaerobes in ejaculates of subfertile men. *Hum Reprod Update* 1:462-478,1995.
- Eley A, Pacey AA, Galdiero M, Galdiero F. Can Chlamydia trachomatis directly damage your sperm? *Lancet Infect Dis* 5:53-57,2005.
- Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl* 23:717-723,2002.
- Gerbase AC, Rowley JT, Mertens TE. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Lancet* 351(Suppl 3):2-4,1998.
- Gonzales GF, Muñoz G, Sánchez R, Henkel R, Gallegos-Avila G, Díaz-Gutiérrez O, Vigil P, Vásquez F, Kortebeani G, Mazzoli A, Bustos-Obregón E. Update on the impact of Chlamydia trachomatis infection on male fertility. *Andrologia* 36:1-23,2004.
- Gonzales GF. Function of seminal vesicles and their role on male fertility. *Asian J Androl* 3:251-258,2001.
- Gopalkrishnan K, Hinduja IN, Kumar TC. Semen characteristics of asymptomatic males affected by Trichomonas vaginalis. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 7:165-167,1990.
- Gopalkrishnan K, Joseph R, Sheth AR. Alteration of semen characteristics and regulatory factors in human semen with bacterial infection. *Arch Androl* 32:213-218,1994.
- Grattard F, Soleihac B, De Barbeyrac B, Bebear C, Seffert P, Pozzetto B. Epidemiologic and molecular investigations of genital mycoplasmas from women and neonates at delivery. *Pediatr Infect Dis J* 10:853-858,1995.
- Habermacher GM, Chason JT, Schaeffer AJ. Prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Annu Rev Med* 57:195-206,2006.
- Hall SH, Hamil KG, French FS. Host defense proteins of the male reproductive tract. *J Androl* 23:585-597,2002.
- Harrison PE, Barratt CLR, Robinson AJ, Kessopoulou E, Cooke ID. Detection of white blood cell populations in the ejaculates of fertile men. *J Reprod Immunol* 19:95-98,1991.
- Hillier SL, Rabe LK, Muller CH, Zarutskie P, Kuzan FB, Stenchever MA. Relationship of bacteriologic characteristics to semen indices in men attending an infertility clinic. *Obstet Gynecol* 75:800-804,1990.
- Huwe P, Diemer T, Ludwig M, Liu J, Schiefer HG, Weidner M. Influence of different uropathogenic microorganisms on human sperm motility parameters in an in vitro experiment. *Andrologia* 30(Suppl 1):55-59,1998.
- Ishihara S, Yasuda M, Ito S, Maeda S, Deguchi T. Mycoplasma genitalium urethritis in men. *Int J Antimicrob Agents* 24(Suppl. 1):23-27,2004.
- Ison CA, Easom CS. Carriage of Gardnerella vaginalis and anaerobes in semen. *Genitourin Med* 61:120-122,1985.
- Jarvi K, Lacroix JM, Jain A, Dumitru I, Heritz D, Mittelman MW. Polymerase chain reaction-based detection of bacteria in semen. *Fertil Steril* 66:463-467,1996.
- Judlin P. Genital mycoplasmas. *Gynecol Obstet Fertil* 31:954-959,2003.
- Kaleli S, Ocer F, Irez T, Budak E, Aksu MF. Does leukocytospermia associate with poor semen parameters and sperm functions in male infertility? The role of different seminal leukocyte concentrations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 89:185-191,2000.
- Keck C, Gerber-Schafer C, Clad A, Wilhelm C, Breckwoldt M. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update* 4:891-903,1998.
- Kjaergaard N, Kristensen B, Hansen ES, Farholt S, Schonheyder HC, Uldbjerg N, Madsen H. Microbiology of semen specimens from males attending a fertility clinic. *APMIS* 105:566-570,1997.
- Kong F, James G, Ma Z, Gordon S, Bin W, Gilbert GL. Phylogenetic analysis of Ureaplasma urealyticum--support for the establishment of a new species, Ureaplasma parvum. *Int J Syst Bacteriol* 49:1879-1889,1999.
- Kranjic-Zec I, Dzamic A, Mitrovic S, Arsic-Arsenijevic V, Radonjic I. The role of parasites and fungi in secondary infertility. *Med Pregl* 57:30-32,2004.
- Krause W, Herbstreit F, Slenzka W. Are viral infections the cause of leukocytospermia? *Andrologia* 34:87-90,2002.
- Krieger JN, Riley DE. Chronic prostatitis: Charlottesville to Seattle. *J Urol* 172:2557-2560,2004.
- Krzeminska-Jaskowiak E, Cybulski Z, Pietkiewicz K. Characterization of Candida sp. strains isolated from different clinical specimens in the years 1989-1993. *Przegl Epidemiol* 49:305-311,1995.

53. Larsen, B. & Monif, GR. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin Infect Dis* 32:69-77,2001.
54. Larsson PG, Forsum U. Bacterial vaginosis--a disturbed bacterial flora and treatment enigma. *APMIS* 113:305-316,2005.
55. Lemkecher T, Dartigues S, Vaysse J, Kulski O, Barraud-Lange V, Gattegno L, Wolf JP. Leucocytosp.ermia, oxidative stress and male fertility: facts and hypotheses. *Gynecol Obstet Fertil* 33:2-10,2005.
56. Liu DB, Zhu PY. Detection of IgG and IgM antibodies against Chlamydia trachomatis in semen of asymptomatic infertile patients. *Zhonghua Nan Ke Xue* 9:197-199,2003.
57. Liu JH, Li HY, Cao ZG, Duan YF, Li Y, Ye ZQ. Influence of several uropathogenic microorganisms on human sp.erm motility parameters in vitro. *Asian J Androl* 4:179-182,2002.
58. Ludwig M, Kummel C, Schroeder-Printzen I, Ringert RH, Weidner W. Evaluation of seminal plasma parameters in patients with chronic prostatitis or leukocytosp.ermia. *Andrologia* 30(Suppl 1):41-47,1998.
59. Manhart LE, Critchlow CW, Holmes KK, Dutro SM, Eschenbach DA, Stevens CE, Totten PA. Mucopurulent cervicitis and Mycoplasma genitalium. *J Infect Dis* 187:650-657,2003.
60. Mayser P. Mycotic infections of the penis. *Andrologia* 31(Suppl 1):13-16,1999.
61. Megory E, Zuckerman H, Shoham Z, Lunenfeld B. Infections and male fertility. *Obstet Gynecol Surv* 42:283-290,1987.
62. Merino G, Carranza-Lira S, Murrieta S, Rodriguez L, Cuevas E, Moran C. Bacterial infection and semen characteristics in infertile men. *Arch Androl* 35:43-47,1995.
63. Montagnini Sp.aine D, Mamizuka EM, Pereira Cedenho A, Srougi M. Microbiologic aerobic studies on normal male urethra. *Urology* 56:207-210,2000.
64. Nikkanen V, Gronroos M, Suominen J, Multamaki S. Silent infection in male accessory genital organs and male infertility. *Andrologia* 11:236-241,1979.
65. Nocard E, Roux E. Le microbe de la péripneumonie. *Ann Inst Pasteur* 12:240-262,1898.
66. Nunez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martinez-Ferrer M, Meseguer MA. Ureaplasma urealyticum reduces motility and induces membrane alterations in human sp.ermatozoa. *Hum Reprod* 13:2756-2761,1998.
67. Pacey AA, Eley A. Chlamydia trachomatis and male fertility. *Hum Fertil (Camb)* 7:271-276,2004.
68. Potts JM, Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Hall G, Agarwal A. Association of ureaplasma urealyticum with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytosp.ermia. *J Urol* 163:1775-1778,2000.
69. Purvis K, Christiansen E. Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. *Int J Androl* 16:1-13,1993.
70. Robertson JA, Stemke GW. Expanded serotyping scheme for Ureaplasma urealyticum strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* 15:873-878,1982.
71. Rodin DM, Larone D, Goldstein M. Relationship between semen cultures, leukosp.ermia, and semen analysis in men undergoing fertility evaluation. *Fertil Steril* 79(Suppl 3):1555-1558,2003.
72. Ross JD, Jensen JS. Mycoplasma genitalium as a sexually transmitted infection: implications for screening, testing, and treatment. *Sex Transm Infect* 82:269-271,2006.
73. Sanocka-Maciejewska D, Ciupinska M, Kurpisz M. Bacterial infection and semen quality. *J Reprod Immunol* 67:51-56,2005.
74. Schiefer HG. Microbiology of male urethroadnexitis: diagnostic procedures and criteria for aetiologic classification. *Andrologia* 30(suppl.1):7-13,1998.
75. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl* 22:575-583,2001.
76. Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab* 6:495-501,2005.
77. Skidmore S, Horner P, Mallinson H. Testing sp.ecimens for Chlamydia trachomatis. *Sex Transm Infect* 82:272-275,2006.
78. Sobel JD. What's new in bacterial vaginosis and trichomoniasis? *Infect Dis Clin North Am* 19:387-406,2005.
79. Soffer Y, Ron-El R, Golan A, Herman A, Casp.i E, Samra Z. Male genital mycoplasmas and Chlamydia trachomatis culture: its relationship with accessory gland function, sp.erm quality, and autoimmunity. *Fertil Steril* 53:331-336,1990.
80. Sp.iliopoulou A, Lakiotis V, Vittoraki A, Zavou D, Mauri D. Chlamydia trachomatis: time for screening? *Clin Microbiol Infect* 11:687-689,2005.
81. Stovall DW, Bailey LE, Talbert LM. The role of aerobic and anaerobic semen cultures in asymptomatic couples undergoing in vitro fertilization: effects on fertilization and pregnancy rates. *Fertil Steril* 59:197-201,1993.
82. Styler M, Shapiro SS. Mollicutes (mycoplasma) in infertility. *Fertil Steril* 44:1-12,1985.
83. Svenstrup HF, Fedder J, Abraham-Peskir J, Birkelund S, Christiansen G. Mycoplasma genitalium attaches to human sp.ermatozoa. *Hum Reprod* 18:2103-2109,2003.
84. Taylor-Robinson D, Furr PM. Update on sexually transmitted mycoplasmas. *Lancet* 351(suppl.3):12-15,1998.
85. Taylor-Robinson D, Horner PJ. The role of Mycoplasma genitalium in non-gonococcal urethritis. *Sex Transm Infect* 77:229-231,2001.
86. Taylor-Robinson D. Mycoplasma genitalium -- an up-date. *Int J STD AIDS*. 13:145-151,2002.
87. Taylor-Robinson D. Ureaplasma urealyticum (T-strain mycoplasmas) and Mycoplasma hominis. In: Principles and practice of infectious diseases, vol. 2. Mandell G, Douglas R, Bennett J (eds). New York, Churchill and Livingstone Inc.;1990, p. 1458-1463.
88. Tomlinson MJ, Barratt CL, Cooke ID. Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil Steril* 60:1069-1075,1993.
89. Tully JG, Taylor-Robinson D, Cole RM, Rose DL. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *Lancet* 1:1288-1291,1981.
90. Vetere A, Borriello SP, Fontaine E, Reed PJ, Taylor-Robinson D. Characterisation of anaerobic curved rods (Mobiluncus sp.p.) isolated from the urogenital tract. *J Med Microbiol* 23:279-288,1987.
91. Veznik Z, Posp.isil L, Svecova D, Zajicova A, Unzeitig V. Chlamydiae in the ejaculate: their influence on the quality and morphology of sp.erm. *Acta Obstet Gynecol Scand* 83:656-660,2004.
92. Vicino M, Loverro G, Simonetti S, Mei L, Selvaggi L. The correlation between idiopathic leukocytosp.ermia, embryo quality and outcome in the FIVET and ICSI procedures. *Minerva Ginecol* 51:413-420,1999.
93. Vigil P, Morales P, Tapia A, Riquelme R, Salgado AM. Chlamydia trachomatis infection in male partners of infertile couples: incidence and sp.erm function. *Andrologia* 34:155-161,2002.
94. Villegas H, Arias F, Flores E, Casanova G, Karchmer S. Ultrastructural characteristics of Gardnerella vaginalis infection in the heterosexual couple. *Arch Androl* 39:147-153,1997.
95. Wagenlehner FM, Weidner W, Naber KG. Chlamydial infections in urology. *World J Urol* 24:4-12,2006.
96. Wang AW, Politch J, Anderson DJ. Leukocytosp.ermia in male infertility patients in China. *Andrologia* 26:167-172,1994.
97. Weidner W, Krause W, Ludwig M. Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with sp.ecial focus on prostatitis. *Hum Reprod Update* 5:421-432,1999.
98. Willen M, Holst E, Myhre EB, Olsson AM. The bacterial flora of the genitourinary tract in healthy fertile men. *Scand J Urol Nephrol* 30:387-393,1996.
99. Wittemer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongieres C, Viville S, Nisand I. Abnormal bacterial colonisation of the vagina and implantation during assisted reproduction. *Gynecol Obstet Fertil* 32:135-139,2004.
100. Wolff H, Politch JA, Martinez A, Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ. Leukocytosp.ermia is associated with poor semen quality. *Fertil Steril* 53:528-536,1990.
101. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril* 63:1143-1157,1995.
102. Xu C, Lu MG, Feng JS, Guo QS, Wang YF. Germ cell apoptosis induced by ureaplasma urealyticum infection. *Asian J Androl* 3:199-204,2001.
103. Yanushpolsky EH, Politch JA, Hill JA, Anderson DJ. Is leukocytosp.ermia clinically relevant? *Fertil Steril* 66:822-825,1996.
104. Yoshida T, Deguchi T, Ito M, Maeda S, Tamaki M, Ishiko H. Quantitative detection of Mycoplasma genitalium from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 40:1451-1455,2002.
105. Yoshida T, Maeda S, Deguchi T, Miyazawa T, Ishiko H. Rapid detection of Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Ureaplasma parvum, and Ureaplasma urealyticum organisms in genitourinary samples by PCR-microtiter plate hybridization assay. *J Clin Microbiol* 41:1850-1855,2003.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Rua Irmãos D'Ângelo 48 sala 101
 CEP: 25.685-330 Petrópolis, RJ
 Telefax 0-xx-24-22376173
 e-mail: ftarocho@yahoo.com.br

Panorama da Hepatite C no estado de Santa Catarina e na cidade de Florianópolis

An overview of Hepatitis C in the state of Santa Catarina and in the city of Florianópolis

Sabrina Gonçalves¹, Elaine Nunes Daminelli¹, Celso Spada² & Patrícia Haas²

RESUMO - O objetivo deste estudo foi traçar um panorama da infecção por hepatite C no Estado de Santa Catarina e na cidade de Florianópolis, no período entre 2002 e 2004, considerando aspectos epidemiológicos como: número notificado de casos de hepatite C, faixa etária, sexo e provável fonte de infecção. Os dados foram obtidos a partir de levantamento bibliográfico e consulta à Secretaria de Vigilância Epidemiológica do Estado de Santa Catarina. No período de 2002 a 2004, foram notificados 1667 casos no Estado de Santa Catarina e 348 casos de infecção por hepatite C na cidade de Florianópolis. A faixa etária mais acometida por esta infecção tanto em Santa Catarina como em Florianópolis foi de 35 a 44 anos (36,17%) e (42,82%), respectivamente, no período avaliado. O sexo masculino foi o mais atingido tanto no Estado (69,59%) quanto no Município (69,54%) no respectivo período. As principais vias de infecção pelo vírus verificadas em Santa Catarina e em Florianópolis nos anos de 2002 a 2004 foram o uso de drogas injetáveis (22,25%) e (21,55%), o contato sexual (15,24%) e (14,37%) e a via transfusional (10,92%) e (11,78%), respectivamente. A realidade epidemiológica da hepatite C é bastante similar tanto em Santa Catarina quanto em Florianópolis, entretanto, fornecem apenas um panorama da situação da hepatite C e sugerem que ainda é crescente o número de casos dessa doença em Santa Catarina, sendo que a subnotificação ainda constitui-se em um problema que pode comprometer os números apresentados.

PALAVRAS-CHAVE - Hepatite C, epidemiologia. Fatores de risco. Uso de drogas. Santa Catarina, Florianópolis.

SUMMARY - The aim of this study was provide an overview of hepatitis C infection in the state of Santa Catarina and in the city of Florianópolis, for the period of 2002 through 2004, taking into consideration such epidemiological aspects as: notified number of cases of hepatitis C, age, sex and probable source of infection. Data were obtained through a literature review and by consulting with Secretaria de Vigilância Epidemiológica do Estado de Santa Catarina. From 2002 through 2004, 1667 cases of infection for hepatitis C in the state Santa Catarina and 348 cases in the city Florianópolis had been notified. In terms of age, the highest incidence was found among those 35 to 44 years old in Santa Catarina (36,17%) and in Florianópolis (42,82%). In both state (69,59%) and city (69,54%) there was a larger number of cases among males than among females. The main source of infection for the virus verified in Santa Catarina and Florianópolis from 2002 through 2004 had been the use of injectable drugs (22,25%) and (21,55%), sexual contact (15,24%) and (14,37%) and transfusional source (10,92%) and (11,78%), respectively. The reality epidemiological of hepatitis C is sufficiently similar such in Santa Catarina as in Florianópolis, however, they supply only an overview of the situation of hepatitis C and suggest that still the number of cases of this illness in Santa Catarina is increasing, being that underreporting still consists in a problem that can compromise the presented numbers.

KEYWORDS - Hepatitis C, epidemiology. Risk factors. Drug usage. Santa Catarina, Florianópolis.

INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite C (HCV) é transmitido através de exposição percutânea (parenteral) por agulhas ou outros instrumentos contaminados. A transfusão de sangue e seus derivados, fora da recomendação técnica (sem investigação laboratorial para doenças transmissíveis), os procedimentos odontológicos, cirúrgicos e de hemodiálise que desrespeitam as normas universais de biossegurança, além do uso de drogas injetáveis e transmissão perinatal também podem promover a transmissão do vírus²⁰. A transmissão vertical (mãe para filho) ocorre em 0 a 35,5% dos partos de mães infectadas, dependendo principalmente da quantidade de vírus circulante no momento do parto e co-infecção com HIV. Há risco maior no parto normal que na cesariana e o aleitamento materno parece ser seguro, mas os estudos em ambos os casos são conflitantes⁷. A transmissão por outros fluidos biológicos como saliva, lágrima, urina, sêmen e secreção vaginal podem ocorrer, porém, os riscos são baixos. O período de incubação para hepatite C é de 20 a 140 dias, com média de 80 dias⁵. Estima-se que cerca de 3% da população mundial (170 milhões de pessoas) esteja infectada com o vírus da hepatite C, causa principal da cirrose e eventualmente do hepatocarcinoma. Segundo a Organização Mundial de Saúde, é possível que surjam a cada ano três a quatro milhões de novos casos de hepatite C no planeta⁴. A prevalência de HCV, com base em dados de pré-doadores de sangue, pode variar entre índices menores que 1% em países como

Canadá, Reino Unido, Escandinávia, Nova Zelândia e algumas áreas do Japão, ou chegar a altas taxas como 26% no Cairo e 30% no Egito e África do Sul⁷.

No Brasil, estima-se que a infecção já atingiu mais de 2% da população (mais de 3,3 milhões de pessoas)¹. Com base em dados da rede de hemocentros, 2004, a distribuição de casos de HCV variou entre as regiões brasileiras: 2,1% no Norte; 1% no Nordeste; 1,2% no Centro-Oeste; 1,4% no Sudeste e 0,7% no Sul (2). No Estado de Santa Catarina em 1999, 2000 e 2001 a prevalência de HCV foi 0,38%, 0,31% e 0,34%, respectivamente¹⁴.

O diagnóstico laboratorial do HCV pode ser realizado através de análises sorológicas, no entanto, o anticorpo anti-HCV demora de 4 a 6 semanas para se tornar detectável no sangue dos pacientes, podendo persistir indefinidamente ou desaparecer após a cura. Análises baseadas em técnicas de Biologia Molecular como PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) também podem ser utilizadas, pois podem indicar a presença ou não do vírus por sua alta sensibilidade e especificidade, além de fornecer uma perspectiva sobre a carga viral¹⁴.

A hepatite viral pode ser aguda, crônica ou fulminante, definida pela duração ou gravidade da infecção. As características clínicas, bioquímicas, imunológicas e histológicas da hepatite viral caracterizam a doença, sendo refletida pela elevação da bilirrubina sérica, gama globulina e transaminases hepáticas (AST, ALT) a valores duas vezes acima do fisiológico, levando a injúria hepatocelular que resulta em sinais e sintomas físicos⁵.

Recebido em 06/12/2006

Aprovado em 20/12/2007

¹Mestres em Farmácia pela UFSC;

²Professores do Departamento de Análises Clínicas (UFSC).

Na fase aguda da doença o paciente pode apresentar desde sintomas inespecíficos como febre, mal estar, cefaléia, dores musculares, náuseas e vômitos até sintomas como icterícia (pele e olhos amarelados), colúria (urina muito escura) e hipo ou acolia fecal (fezes esbranquiçadas). Ao exame físico, o fígado encontra-se ligeiramente aumentado e doloroso. Entretanto, estes sintomas só estão presentes em 30% a 40% dos casos, fazendo com que muitas vezes o diagnóstico só seja estabelecido na fase crônica da doença²⁰. A fase crônica da doença é caracterizada pela presença de HCV-RNA por período prolongado (superior a seis meses) sendo que 50 a 70% dos pacientes evoluem para a fase crônica. Destes, cerca de 20% evoluem para cirrose, onde a estrutura hepática encontra-se comprometida. Estes pacientes têm um risco de 1 a 4% ao ano de desenvolver câncer de fígado. Estudos em hemocentros mostraram que a prevalência de doadores com anti-HCV positivo foi de 1,23%. Como nem todos os pacientes com o anticorpo apresentam o vírus estima-se que a prevalência da infecção crônica pelo HCV esteja por volta de 1,2% da população do Brasil. No entanto, a estimativa de incidência geral aponta para, aproximadamente o dobro desse percentual¹. A hepatite C é uma doença viral hepatotrópica, cujo tratamento consiste na aplicação de injeções subcutâneas de interferon e/ou interferons modificados. O interferon é uma proteína produzida naturalmente pelo organismo, com a função de atuar contra vírus invasores, ativando o sistema imunológico e interferindo na reprodução destes vírus, enquanto os medicamentos com interferons são uma reprodução sintética do interferon que o organismo produz¹⁹. O objetivo do presente estudo foi traçar um panorama da infecção por hepatite C no Estado de Santa Catarina e na cidade de Florianópolis (capital do Estado de Santa Catarina), no período entre 2002 e 2004, considerando aspectos epidemiológicos como: número notificado de casos de hepatite C, faixa etária, sexo e provável fonte de infecção.

FONTE DOS DADOS

Os dados utilizados neste estudo foram obtidos a partir de levantamento bibliográfico e consultas à Divisão de Vigilância das Doenças Imunopreveníveis do Estado de Santa Catarina (Secretaria de Vigilância Epidemiológica), referente ao período de 2002 a 2004. Primeiramente, foram levantados dados sobre hepatite C no Estado de Santa Catarina e na cidade de Florianópolis a fim de se estabelecer um comparativo. Além do número total de casos, foram considerados os aspectos de incidência por faixa etária, sexo e provável fonte de infecção no período entre 2002 e 2004.

RESULTADOS

Conforme dados da Secretaria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina, no período entre 2002 e 2004 foram notificados 1.667 casos de infecção por hepatite C no Estado de Santa Catarina e 348 casos em Florianópolis. As figuras 1 e 2 mostram o número de casos confirmados de hepatite C no Estado de Santa Catarina e na cidade de Florianópolis, respectivamente, segundo o ano de notificação. As figuras 3 e 4 mostram a distribuição dos casos de hepatite C por faixa etária em Santa Catarina e em Florianópolis, respectivamente, para o período entre 2002 e 2004. A tabela 1 mostra a distribuição dos casos de hepatite C, tanto no Estado quanto na Capital, conforme o sexo, no mesmo período. Tanto em Santa Catarina quanto em Florianópolis observou-se que a principal via de infecção pelo vírus da Hepatite C foi o uso de drogas injetáveis (tabelas 2 e 3)¹⁵.

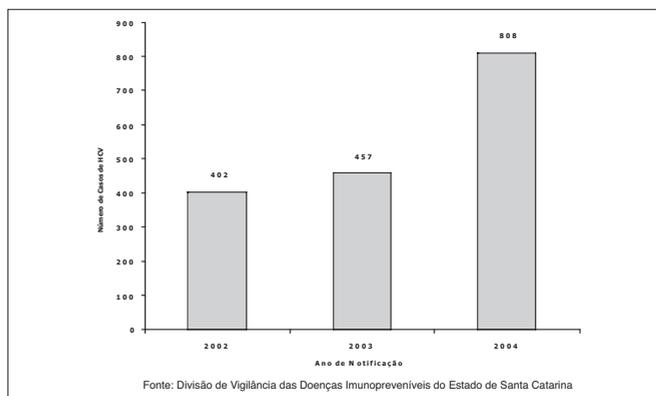


Figura 1. Número de casos notificados de HCV em Santa Catarina no período de 2002 a 2004.

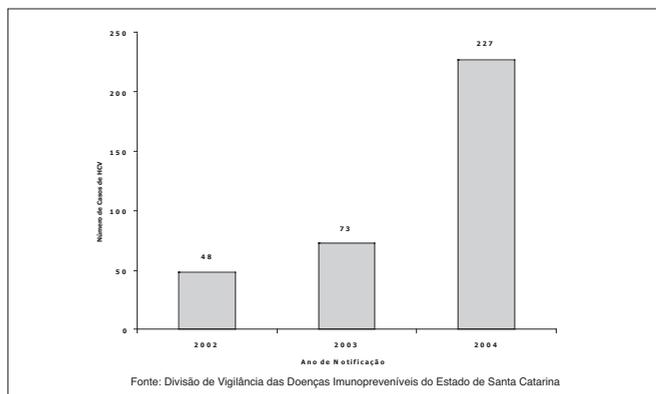


Figura 2. Número de casos notificados de HCV em Florianópolis no período de 2002 a 2004.

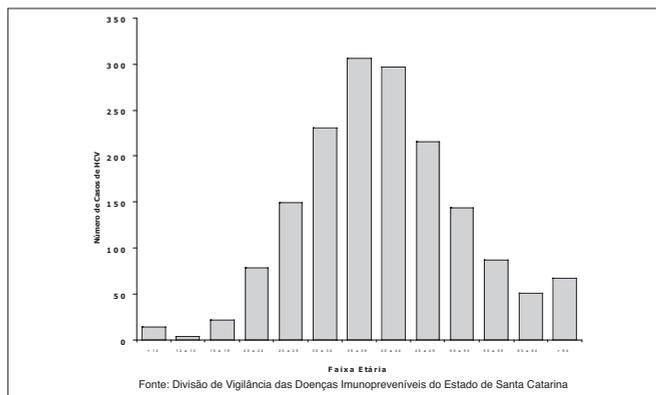


Figura 3. Número de casos de HCV, segundo faixa etária, em Santa Catarina no período de 2002 a 2004.

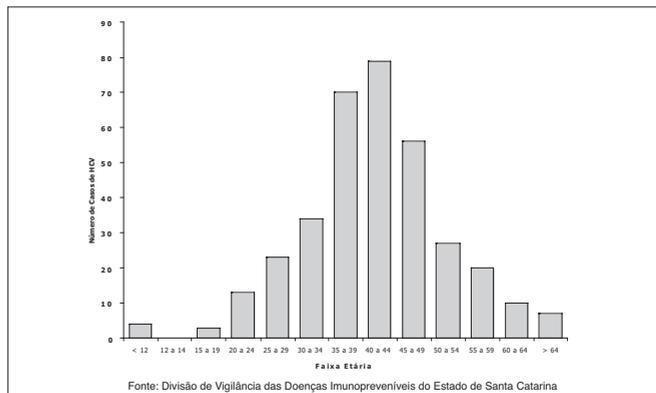


Figura 4. Número de casos de HCV, segundo faixa etária, em Florianópolis no período de 2002 a 2004.

TABELA I
Distribuição dos casos de hepatite C segundo sexo, em Santa Catarina e em Florianópolis, no período entre 2002 e 2004¹⁵.

Santa Catarina				Florianópolis			
Sexo		Sexo		Sexo		Sexo	
Masculino	%	Feminino	%	Masculino	%	Feminino	%
1.160	69,59	507	30,41	242	69,54	106	30,46

Fonte: Divisão de Vigilância das Doenças Imunopreveníveis do Estado de Santa Catarina

TABELA II
Distribuição de casos de HCV, segundo provável fonte de infecção, em Santa Catarina, no período de 2002 a 2004¹⁵.

Vias de Infecção	Número de Casos de HCV	%
Sexual	254	15,24
UDI	371	22,25
Transfusional	182	10,92
Vertical (mãe/recém-nascido)	7	0,42
Acidente de Trabalho	16	0,96
Domiciliar	5	0,30
Tratamento cirúrgico/dentário	51	3,06
Outros	74	4,44
Ignorado	707	42,41

Fonte: Divisão de Vigilância das Doenças Imunopreveníveis do Estado de Santa Catarina

TABELA III
Distribuição de casos de HCV, segundo provável fonte de infecção, em Florianópolis, no período de 2002 a 2004¹⁵.

Vias de Infecção	Número de Casos de HCV	%
Sexual	50	14,37
UDI	75	21,55
Transfusional	41	11,78
Vertical (mãe/recém-nascido)	1	0,29
Acidente de Trabalho	9	2,59
Domiciliar	0	0
Tratamento cirúrgico/dentário	6	1,72
Outros	21	6,03
Ignorado	145	41,67

Fonte: Divisão de Vigilância das Doenças Imunopreveníveis do Estado de Santa Catarina

DISCUSSÃO

O aumento da incidência de hepatite C tanto em Santa Catarina como na cidade de Florianópolis segue a tendência nacional. Isto se deve, provavelmente, a falta de atenção básica à saúde como prevenção, triagem sorológica, exames confirmatórios e acompanhamento de pacientes assintomáticos, bem como à distribuição desigual dos recursos financeiros para os municípios, pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Segundo FREITAS *et al*⁶ (2001), a distribuição dos recursos de saúde pelo SUS privilegia áreas com melhores indicadores de saúde. Tal fato é compreensível em face da crise continuada do financiamento do setor saúde e da baixa efetividade dos sistemas de saúde municipais, principalmente sob o ponto de vista epidemiológico. Entretanto, com a crescente informatização e disponibilidade de dados de saúde no Brasil, através da internet (por exemplo, Sistema de Informações sobre Saúde do Ministério da Saúde, DATASUS), este tipo de análise é um primeiro passo para identificar áreas de prioridade.

Tanto em Santa Catarina como em Florianópolis, no período estudado, houve maior predomínio de hepatite C na faixa etária de 35 a 44 anos (36,17%, 603/1.667) e (42,82%, 149/348), respectivamente, corroborando os dados da literatura internacional em que as maiores infecções pelo HCV são encontradas em indivíduos entre 30-49 anos de idade, indicando que o risco de transmissão afeta primariamente adultos jovens.¹⁹ Em um estudo realizado no Brasil e no Estado de Santa Catarina, no período de 1996 a 2000, também se pôde observar que a faixa etária acima dos 30 anos foi a mais acometida pela hepatite B e C³.

O grupo etário de 35 a 44 anos, segundo nossos relatos, foi o mais atingido, provavelmente, em decorrência do uso de drogas ilícitas endovenosas ou convivência com usuários, relação sexual com usuários de drogas não injetáveis. Em países como Estados Unidos e Austrália, onde a maior soroprevalência está entre pessoas de meia-idade, o uso de drogas injetáveis tem sido a via predominante de transmissão para indivíduos com mais de 30 anos¹⁶.

Embora tenhamos observado uma incidência maior de hepatite C no sexo masculino, não há evidências que comprovem uma maior suscetibilidade desse sexo à infecção viral, tal resultado se deve, provavelmente, a fatores comportamentais. O predomínio maior de indivíduos do sexo masculino com HCV tanto no Estado (69,59%) quanto no Município (69,54%) no período estudado, igualmente confirma outros achados em populações semelhantes, tais como verificados em São Paulo (69,3%) e Belém (74,1%)¹¹.

As principais vias de infecção pelo vírus verificadas em Santa Catarina e em Florianópolis nos anos de 2002 a 2004 foram o uso de drogas injetáveis (22,25%) e (21,55%), o contato sexual (15,24%) e (14,37%) e a via transfusional (10,92%) e (11,78%), respectivamente.

Atualmente, o uso de drogas injetáveis é a principal via de transmissão da hepatite C, pois o uso de seringas compartilhadas ou equipamentos contaminados, utilizados no preparo de drogas, facilita a infecção pelo HCV. Na Europa, a incidência do HCV nos consumidores de drogas injetáveis é elevada, variando entre 30% a 90%. O mesmo se observa em alguns Estados do Brasil em que a taxa de infecção pelo HCV em jovens usuários é quatro vezes maior do que a infecção pelo HIV e segundo o Ministério da Saúde, 2004, após 5 anos de uso de drogas até 90% dos usuários podem se infectar com o vírus¹.

A contribuição da transmissão sexual, para o vírus da hepatite C permanece controversa, entretanto, há concordância de que a hepatite C é menos transmitida sexualmente que a hepatite B. Em parceiros fixos de pessoas contaminadas, a prevalência de infecção pelo HCV é de apenas 0,4 a 3%, sendo que muitas vezes encontramos outros fatores de risco que podem ser a causa da infecção. Por outro lado, entre pessoas sem nenhum outro fator de risco, encontramos 2 a 12% de infecção pelo HCV em pessoas sexualmente promíscuas²⁷.

NEUMAYR *et al*¹² (1999), após avaliarem apenas o genótipo entre 8 casais, relataram 2 concordantes, sendo que apenas 1 não apresentou outro fator de risco evidente, mostrando que a transmissão sexual é possível, mas infreqüente, para cônjuges monogâmicos de pacientes portadores crônicos do HCV e os riscos parecem não estar relacionados com a intensidade e duração da relação sexual. TANAKA *et al*¹⁸ (1997), observaram que esposas de parceiros sexuais portadores do HCV apresentavam risco duas vezes maior de contrair a doença que as esposas de parceiros HCV negativos. No Brasil existem poucos relatos sobre a transmissão sexual do HCV. Entre os mais evidentes pode-se citar MESQUITA *et al*¹⁰ (1997), trabalharam com uma população brasileira de prostitutas e seus clientes, analisando os fatores de risco associados com a transmissão da hepatite C, sugerindo um importante papel da transmissão sexual na epidemiologia do HCV, principalmente quando o comportamento sexual promíscuo entra em cena. A prevalência do HCV nesta população foi de 15,3%, este índice gira em torno de 2,2% para bancos de sangue. Os autores concluíram que a transmissão sexual seja responsável, em boa parte, pela manutenção da infecção pelo HCV na espécie humana.

Nos últimos anos, com a adoção de medidas de rastreamento sistemático de todas as doações de sangue, o risco de infecção pelo HCV pós-transfusional tornou-se praticamente desprezível, com riscos entre 0,01% e 0,001%, mas podendo ocorrer

rer se a doação acontecer no período de janela imunológica⁸. A terceira via de infecção pelo HCV, em Santa Catarina e em Florianópolis, foi a via transfusional e, pelas porcentagens obtidas, o motivo não foi somente a possibilidade de resultados falso-negativos, causados pela janela imunológica observados em bancos de sangue, mas também as elevadas prevalências de anti-HCV observadas em hemofílicos e hemodialisados que contraíram a infecção antes da adoção de medidas preventivas, ou seja, nos anos precedentes a 1993. Nos hemofílicos, a prevalência de infecção pelo HCV oscila entre 53% a 89% em vários países do mundo. No Brasil esses índices são de 87,3%, enquanto nos pacientes hemodialisados verificamos percentuais que variam de 19,0% a 47,2%. Quando analisamos a distribuição da prevalência do HCV por Regiões do Brasil no grupo de pacientes hemodialisados, verificamos que as maiores taxas são encontradas nas Regiões Norte (45,50%) e Sul do país (43,64%)¹³. Em relação às vias de infecção vertical, domiciliar e outras formas parenterais de contaminação como procedimentos cirúrgicos/odontológicos, *piercing*, tatuagens e acupuntura notou-se que os resultados deste estudo foram semelhantes aos da literatura (Tabelas 2 e 3).

As formas parenterais de contaminação, bem como a transmissão domiciliar, caracterizada pelo uso de alicate da manicura, lâmina do barbeiro ou mesmo a escova de dente, compartilhada por cônjuges ou filhos, são casos eventualmente rotulados como esporádicos, por serem afastados os casos de transfusão de sangue ou o uso de drogas ilícitas e são responsáveis por pelo menos 12% dos casos de transmissão de hepatite C¹⁷.

Os casos de acidente de trabalho com amostras biológicas de indivíduos HCV positivos em Florianópolis apresentou um índice um pouco maior de infecção por esta via, já em Santa Catarina estão de acordo com os dados da literatura (Tabelas 2 e 3). O risco de transmissão ocupacional após um acidente percutâneo com paciente-fonte HCV positivo é de aproximadamente 1,8% (variando entre 0 a 7%)².

Tanto os elevados índices de casos ignorados quanto a provável fonte de infecção, foram em decorrência, provavelmente, da desatenção ou do inadequado preenchimento da ficha de investigação pelo profissional da saúde, principalmente no que se refere à classificação etiológica (tipo de vírus) e seus marcadores sorológicos. Entretanto, deve-se levar em consideração que cerca de 5% dos casos onde os fatores de risco não são identificáveis, provavelmente, estão relacionados à pobreza, comportamentos sexuais de risco, escolaridade inferior a 12 anos, divórcio ou separação e consumo de cocaína intranasal, mas a razão para esta associação ainda está por ser esclarecida⁹.

A realidade epidemiológica da hepatite C é bastante similar entre Santa Catarina e Florianópolis, entretanto fornece apenas um panorama da situação da hepatite C e sugere que ainda é crescente o número de casos dessa doença. Contudo, deve-se considerar ainda que o número de casos pode ser maior, haja vista a subnotificação. Além disso, pode-se observar que a sensibilização das pessoas para a prevenção ao HCV no Estado encontra-se ainda numa fase primária e a prevenção da sua transmissão permanece difícil. Como não existe nenhuma vacina contra este vírus, os novos tratamentos antivirais combinados melhoraram significativamente as opções de tratamento para o controle da doença e para a melhoria da qualidade de vida. Baseado nisso, torna-se importante a repetição de análises semelhantes para que se possa monitorar o comportamento da hepatite C no Estado e também no País.

REFERÊNCIAS

1. BRASIL, Ministério da Saúde. Programa Estadual de DST/AIDS divisão de Vigilância Epidemiológica. Boletim Epidemiológico DST/AIDS. Ano II, Nº 01, janeiro de 2004.
2. Centers for Disease Control and Prevention – CDC – Update US: Public health service guidelines for management of occupational exposures to HBV, HCV and HIV and recommendations for postexposure prophylaxis. *MMWR* 2001; 50: 1-52.
3. Chávez JH, Campana SG, Haas P. Panorama da hepatite B no Brasil e no Estado de Santa Catarina. *Rev Panam Salud Publica* 2003; 14 (2):91-96.
4. Cimerman S. Hepatite C: A epidemia silenciosa. Disponível em: http://www.lincx.com.br/lincx/saude_a_z/outras_doencas/hepatite.asp. [2005 dez 22].
5. Dipiro J, Talbert RL, Yee G, Matzke GR, Wells BG, Posey LM. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. 40 th. United States: Appleton & Lange, 1999: 653.
6. Freitas SFT, Kupek E, Ferraro MC. Distribuição de recursos de saúde no Estado de Santa Catarina, Brasil: um subsídio para discussões sobre o financiamento em saúde. *Rev Panam Salud Publica* 2001; 10 (2):95-100.
7. Jorge SG. Hepatite C. Hepcentro. Disponível em: http://www.hepcentro.com.br/hepatite_c.htm. [2005 dez 23].
8. Legler TJ, Riggert J, Simson G, Wolf C, Humpe A, Munzel U, Uy A, Kohler M, Heermann KH. Testing of individual blood donations for HCV RNA reduces the residual risk of transfusion-transmitted HCV infection. *Transfusion* 2000; 40 (10): 1192-7.
9. Macedo G. Epidemiologia. Hepatite C. Biblioteca das Hepatites Víricas. Perumanayer Portugal 2001:3-6.
10. Mesquita PE, Granato CF, Castelo A. Risk factors associated with hepatitis C virus (HCV) infection among prostitutes and their clients in the city of Santos, Sao Paulo State, Brazil. *J Med Virol* 1997; 51(4):338-43.
11. Monteiro MRCC. Estudo soro epidemiológico dos vírus da hepatite B e hepatite C em portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana/Sida na cidade de Belém, Pará – Brasil. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2002.
12. Neumayr G, Propst A, Schwaighofer H, Judmaier G, Vogel W. Lack of evidence for the heterosexual transmission of hepatitis C. *QJM* 1999; 92(9):505-8.
13. Relatório do Grupo de Estudo da Sociedade Brasileira de Hepatologia. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil. Disponível em: <http://www.sbhepatologia.org.br/nacional/Epidemiologia/S3.htm>. [2004 dez 20].
14. Rosini N, Mousse D, Spada C, Treitinger A. Seroprevalence of HbsAg, Anti-HBc and Anti-HCV in Southern Brazil, 1999-2001. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2003; 7(4): 262-267.
15. Secretaria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina. Divisão de Vigilância das Doenças Imunopreveníveis do Estado. Sistema de Informações de Agravos de Notificação. Florianópolis: Secretaria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina; 2005.
16. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005;5: 558-67.
17. Strauss E. Hepatite C. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2001; 34(1):69-82.
18. Tanaka K, Stuver SO, Ikematsu H, Okayama A, Tachibana N, Hirohata T, Kashiwagi S, Tsubouchi H, Mueller NE. Heterosexual transmission of hepatitis C virus among married couples in southwestern Japan. *Int J Câncer* 1997; 72(1):50-5.
19. Thomson BJ, Finch RG. Hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 86-94.
20. Velosa J, Marinho R, Gouveia A. Factores de risco para o carcinoma hepatocelular em doentes com cirrose hepática. *J Port Gastroenterol* 1994; 1: 1-10.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Autor responsável: Sabrina Gonçalves

Endereço: Rua Santa Luzia, 146 apto 02 Centro

CEP: 36570-000 - Viçosa - MG

Telefone: (0xx31) 3892-4709

E-mail: ss_gon2003@yahoo.com.br

Análise molecular de estirpes de *Escherichia coli* isoladas a partir de amostras de urina de pacientes ambulatoriais por RFLP da região intergênia 16s-23s`

Molecular analysis based on intergenic 16s-23s RFLP of *Escherichia coli* strains obtained from urine samples of ambulatorial patients

Gisele Kleine Neves¹, Iriane Eger Mangrich², Cassia Maria Zoccol³,
Rafael Cancian⁴ & Darlene Camati Persuhn⁵

RESUMO - A análise de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) da região intergênica 16S-23S rDNA tem sido utilizada na diferenciação de estirpes de vários microrganismos. A digestão do produto de amplificação da região intergênica em isolados uropatogênicos de *Escherichia coli* com a enzima RsaI gerou dois padrões distintos, separando as estirpes em dois grupos: alfa e beta. Este trabalho teve como objetivo enquadrar dentro destes grupos 60 estirpes de *E. coli* isoladas a partir de urina de pacientes ambulatoriais no Laboratório Médico Santa Luzia (Florianópolis). Os produtos de amplificação foram digeridos com a enzima RsaI. Os fragmentos resultantes foram submetidos a análise eletroforética em gel de agarose 2% e as estirpes com padrões de restrição condizentes foram agrupadas. Através destas análises foi possível estabelecer correlações entre o perfil molecular e outros dados de análise bioquímica e de resistência a antibióticos.

PALAVRAS-CHAVE - *Escherichia coli*, RFLP, 16S-23S

SUMMARY - RFLP analysis of 16S-23S rDNA intergenic region have been used in differentiation of many microorganisms strains. The digestion of the product of intergenic region amplification in uropathogenic strains of *Escherichia coli* with RsaI generated two distinct patterns: alpha and beta. This project had the aim of classify 60 *Escherichia coli* strains obtained from ambulatorial patients urine of the Laboratório Médico Santa Luzia (Florianópolis). The amplification products were digested with RsaI enzyme. The fragments were submitted to electrophoretic analysis in 2% agarosis gel. Strains with the same restriction pattern were identified. This analysis allowed the correlation between molecular profile and biochemical and antibiologic resistance data.

KEYWORDS - *Escherichia coli*, RFLP, 16S-23S

INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário é uma das infecções bacterianas mais frequentemente adquiridas e a *E. coli* é responsável por cerca de 90% das ITUs de pacientes ambulatoriais (KUNIN, 1997). A ITU acomete homens e mulheres em qualquer idade, sendo, entretanto, diferentes as frequências nos sexos feminino e masculino e nas diversas faixas etárias. Cerca de 10 a 50% das mulheres apresentarão ITU em alguma fase de suas vidas (MARANGONI *et al.*, 1998). A população selecionada tem, portanto, importância e utilidade clínica indiscutíveis.

Atualmente, várias classes de compostos são usadas para identificar bactérias, incluindo ácidos nucleicos, proteínas, lipopolissacarídeos, carboidratos e lipídeos. A relativa utilidade destas classes químicas depende das diferenças taxonômicas em suas ocorrências da rapidez e simplicidade dos métodos usados para analisá-los. O sequenciamento de ácidos nucleicos e a análise de ácidos graxos são dois dos mais promissores e versáteis métodos (BÖTTGER, 1996). A análise de DNA tem sido usada em um grande número de estudos em taxonomia e tipagem bacteriana, bem como para o maior entendimento do mecanismo básico da evolução (GÜRTLER & MAYALL, 2001).

Muitas das técnicas moleculares atualmente usadas para tipagem baseiam-se na separação eletroforética de fragmentos de DNA de comprimento molecular diferentes. O resultado eletroforético é representado por um padrão de bandas em um gel. Uma vez que estes padrões podem ser extremamente complexos, a facilidade com a qual os padrões são interpretados e relacionados é um fator na avaliação da utilidade de um método particular. A dificuldade técnica, custo e tempo de obtenção do resultado também devem ser avaliados para determinar a utilidade de um método (OLIVE & BEAN, 1999).

Métodos de caracterização e taxonomia molecular, baseados na análise do DNA, podem ser divididos em dois grupos: métodos baseados em um único locus e métodos baseados em locus múltiplos. Os métodos baseados em um único locus, normalmente caracterizam um grupo ou uma população de organismos com base na análise de um único gene. Técnicas de sequenciamento de DNA e SSCP (*single stranded conformational polymorphism*) são largamente empregadas. Entretanto, genes que codificam para proteínas ou regiões intergênicas podem não refletir a posição taxonômica destes organismos (HAMPL *et al.*, 2001). Por outro lado, análises feitas com genes sem interferência lateral, como, por exemplo, o gene para o RNA ribossomal de 16S (16S rDNA), não possuem a resolução necessária para se caracterizar organismos a nível intra-específico.

A caracterização molecular através da análise de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) de locus específicos baseados em PCR consiste na amplificação do locus a ser examinado com primers específicos e sua posterior digestão com enzimas de restrição. As regiões dos genes 16S rDNA, 23S rDNA e a região intergênica 16S-23S rDNA têm sido utilizados como alvo desta técnica e podem ser utilizados com sucesso para estirpes bacterianas que apresentam grau de heterogeneidade nos operons de RNAr (OLIVE & BEAN, 1999).

Estudos realizados por Garcia-Martinez e colaboradores (1996) demonstraram que a análise de RFLP da região intergênica 16S-23S de *E. coli* uropatogênicas foi capaz de separar as estirpes em dois grupos denominados alfa e beta. Foram encontradas diferenças consistentes na presença de adenina G e em marcadores fenotípicos entre os grupos, sugerindo que esta metodologia foi eficiente na separação de organismos com características comuns. A análise de seqüências da região intergênica 16S-23S de estirpes tipo de *E. coli* analisadas por perfil de RFLP e encaixadas nos grupos alfa e be-

Recebido em 06/12/2006

Aprovado em 07/01/2008

¹Acadêmica de Medicina – UNIVALI; ²Professora do Curso de Medicina – UNIVALI; ³Farmacêutica do Laboratório Santa Luzia – Florianópolis/SC; ⁴Professor do Curso de Ciências da Computação – UNIVALI; ⁵Professora dos Cursos de Farmácia e Medicina da UNIVALI

ta mostrou as diferenças que levaram aos polimorfismos nos sítios de restrição para as enzimas *RsaI* e *TaqI*. Além disso, esta análise demonstrou que o grupo beta é mais heterogêneo que o alfa (GARCIA-MARTINEZ *et al.*, 1996b).

A caracterização molecular de estirpes de *E. coli* isoladas de pacientes com pielonefrite aguda complicada e não complicada foi realizada pela metodologia de RFLP da região intergênica 16S-23SrRNA. As estirpes isoladas a partir de pacientes portadores de doença não complicada pertenciam substancialmente ao grupo alfa, além de apresentarem uma grande correlação com a presença do gene *pap*, sequência V6-I e multissensibilidade a agentes antimicrobianos. As estirpes isoladas de pacientes com infecção complicada foram bastante heterogêneas quanto à classificação alfa e beta, presença de gene *pap*, sequência V6-I e mostraram multiresistência a antimicrobianos (ANTON *et al.*, 2001).

Tendo em vista estes aspectos, o objetivo deste trabalho foi agrupar estirpes de *Escherichia coli* isoladas de pacientes ambulatoriais com infecção urinária através de dados moleculares de RFLP da região intergênica 16S-23S.

METODOLOGIA

População e amostragem

Foram analisadas 74 estirpes de *E. coli* obtidas a partir de amostras de urina de pacientes ambulatoriais atendidos no Laboratório Médico Santa Luzia (Florianópolis -SC) portadores de infecção urinária. A caracterização bioquímica foi realizada em sistema automatizado Vitek®, assim como o antibiograma.

Extração de DNA cromossomal

Aliquotas de suspensão bacteriana (colônias dispersas em solução de glicerol 80%) foram diluídas na proporção 1:6 em volume final de 30µL e submetidas a incubação a 95° C por 20 minutos. Após centrifugação (1 minuto, 13.000 rpm) em microcentrífuga, cinco microlitros da solução resultante foram utilizadas como DNA molde nas reações de amplificação.

Amplificação da região intergênica 16S-23S

A reação de PCR foi conduzida no termociclador PTC200-MJ Research seguindo as seguintes etapas: um ciclo de desnaturação a 94° C por 3 minutos, 35 ciclos de 93° C por 1 minutos, 62° C por 1 minuto, 36° C por 2 minutos e finalmente uma única etapa de 72° C por 10 minutos.

Os primers utilizados foram:

Primer	Seqüência de nucleotídeos (5'-3')
16S14F	CTTG TACACACCGCCCGTC
23S1R	GGGTTTCCC ATTCG GAAATC

(GARCIA-MARTINEZ *et al.*, 1996)

A concentração dos primers nas reações de amplificação foi de 10 pmol por reação.

Análise de RFLP

Os produtos de amplificação foram digeridos com a enzima *RsaI* cujo sítio de reconhecimento é polimórfico na região intergênica 16S-23S de diferentes estirpes de *E. coli* (GARCIA-MARTINEZ *et al.*, 1996). Os fragmentos resultantes foram analisados em eletroforese, em gel de agarose (2%), em tampão TBE 1X (Tris 0,1mol/L, ácido bórico 0,09 mol/L e EDTA 1mmol/L pH8,3). Os géis foram corados em solução de brometo de etídeo e as bandas visualizadas e fotografadas utilizando luz ultravioleta. O marcador de 100pb (GibcoBRL) foi utilizado como padrão de peso molecular.

Análise dos dados

As 74 estirpes estudadas foram separadas em grupos baseados nos perfil de RFLP encontrados. Os grupos obtidos foram comparados àqueles obtidos pela análise do perfil bioquímico e de resistência a antibióticos.

Os dados obtidos foram analisados através do teste do chi-quadrado a fim de avaliar se as proporções são independentes ou têm uma relação entre si. No caso de relação, a força foi quantificada através do coeficiente de Yule.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram estudadas 74 estirpes de *E. coli* isoladas a partir de amostras de urina de pacientes ambulatoriais atendidos no Laboratório Santa Luzia – Florianópolis. A caracterização bioquímica e de resistência a antimicrobianos (antibiograma) foi realizada pelo sistema automatizado Vitek.

Para efeito das análises propostas por este trabalho, realizou-se um levantamento das características bioquímicas que se mostraram variáveis dentre as estirpes de *E. coli* estudadas. Os parâmetros selecionados foram: crescimento em xilose, rafinose, sacarose e ornitina, além das características de resistência ou sensibilidade a antimicrobianos (ampicilina, cefalotina, bactrim, ácido nalidíxico, amoxicilina e ácido clavulânico, gentamicina). Os dados obtidos foram agrupados nas tabelas 1 e 2.

TABELA I

Perfil de sensibilidade e características bioquímicas

Características de crescimento				Número total de estirpes	Número de estirpes sensíveis	Número de estirpes resistentes
xilose	rafinose	sacarose	ornitina			
+	+	+	+	14	3	11
+	-	-	-	12	6	6
+	+	-	-	1	0	1
+	+	+	-	7	0	7
+	-	+	+	16	10	6
+	-	-	+	17	13	4
-	-	-	-	7	5	2

TABELA II

Perfil de resistência bacteriana (estirpes resistentes a pelo menos uma das drogas)

Estirpe	CF	AP	SFT	AMX	GN	Quinolona
1	S	S	S	S	S	R
2	S	S	R	S	S	S
3	R	R	R	S	S	S
4	S	S	S	S	S	R
5	S	R	R	S	S	S
6	S	R	R	S	S	S
7	S	R	R	S	S	S
8	S	S	R	S	R	R
9	S	R	S	S	S	S
10	S	S	S	S	S	R
11	R	R	S	R	R	S
12	S	S	S	S	S	R
13	S	S	S	S	S	R
14	R	S	S	S	S	S
15	S	R	R	S	S	S
16	R	R	S	R	S	S
17	S	S	S	S	S	R
18	S	R	R	S	S	S
19	R	R	R	S	S	S
20	R	R	R	S	S	S
21	S	R	R	S	S	S
22	S	S	S	S	S	R
23	S	R	R	S	S	S
24	R	S	S	S	S	S
25	S	R	R	S	S	S
26	S	R	R	S	S	S
27	S	R	R	S	S	S
28	R	R	S	S	S	S
29	R	R	R	S	S	S
30	S	S	S	S	S	R
31	S	R	R	S	S	S
32	S	S	R	S	S	S
33	R	S	S	S	S	S
34	S	S	S	S	S	R
35	R	R	R	R	S	S

Legenda: AP – Ampicilina / CF – Cefalotina / SFT – Bactrim / AMX – Amox. e Ác. Clavulânico / GN – Gentamicina / S – Sensível / R – Resistente

A região intergênica 16S-23S de todas as amostras foi amplificada com sucesso e produziram 2 bandas de 650 e 750 pares de base, respectivamente, em cada uma das estirpes, conforme esperado.

O produto de amplificação das 74 estirpes foi submetido à digestão com a enzima *RsaI*. A escolha desta endonuclease de restrição deve-se ao fato que os sítios polimórficos presentes nesta região permitem separar as estirpes de *E. coli* nos grupos moleculares α (quando está presente a banda de 360pb) e β (quando esta presente a banda de 530pb). Os resultados foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,5% e fotografados por câmera Polaroid Kodak conforme descrito na metodologia.

Encontrou-se, a partir desta digestão, 37 estirpes pertencentes ao grupo molecular α e 37 pertencente ao grupo molecular β (Fig. 1).

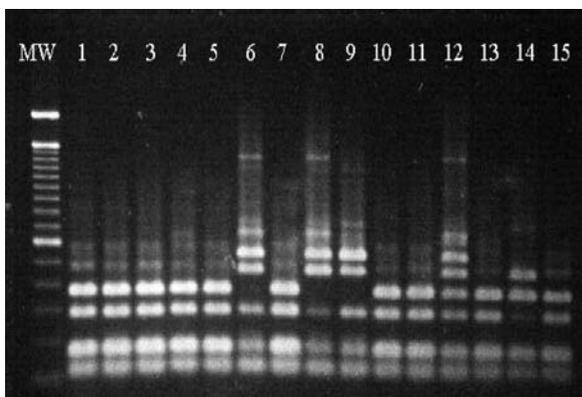


Figura 1. Digestão *RsaI* dos fragmentos resultantes da amplificação da região intergênica 16S – 23S de estirpes de *E. coli*. MW – padrão de peso molecular; 1 – 15 produtos de análise de estirpes de *E. coli*. As linhas 6, 8 e 9 mostram estirpes pertencentes ao grupo molecular beta, uma vez que apresentam a banda de 530 pares de base. Nas demais linhas são mostradas estirpes pertencentes ao grupo alfa, caracterizadas pela presença da banda de 360 pares de base.

Os resultados de RFLP mostraram que, das 39 estirpes sensíveis estudadas, 29 (74%) pertenciam ao grupo molecular α , enquanto que 10 (26%) ao β . Por outro lado, dentre as 35 estirpes resistentes, 8 (23%) se encaixaram no grupo α e 37 (77%) no grupo β (Tabela 3).

TABELA III

Relação do perfil de sensibilidade e o tipo molecular α ou β

	Tipo molecular	Nº de estirpes (%)
Sensível (n=39)	α	29 (74%)*
	β	10 (26%)*
Resistente (n=35)	α	08 (23%)*
	β	27 (77%)*

As estirpes estudadas foram separadas nos grupos: sensível a todos os antibióticos ou resistentes a um ou mais dos antibióticos testados. Os grupos foram analisados quanto a diferença de proporção de estirpes pertencentes ao grupo molecular α ou β baseada no perfil de RFLP da região intergênica 16S-23S (teste do chi-quadrado).

*dados estatisticamente significativos (nível de confiança 99%)

Analisando os grupos moleculares, encontramos que, das 37 estirpes pertencentes ao grupo β , 10 (27%) foram sensíveis a todos os antibióticos testados e 27 (73%) apresentaram alguma resistência. Dentre as 37 α , 29 (78%) mostraram-se sensíveis e as 8 (22%) demais, resistentes (Tabela 4).

TABELA IV

Relação entre o tipo molecular e o perfil de sensibilidade

	Perfil de resistência	Nº de estirpes (%)
α (n=37)	Sensível	10 (27%)*
	Resistente	27 (73%)*
β (n=37)	Sensível	29 (78%)*
	Resistente	8 (22%)*

As estirpes estudadas foram separadas com base no perfil molecular de RFLP da região intergênica. Os grupos obtidos foram analisados quanto a porcentagem. Os grupos α e β foram analisados quanto a diferença de proporção de estirpes resistentes e sensíveis (teste do chi-quadrado).
*dados estatisticamente significativos (nível de confiança 99%)

Estes resultados sugerem uma associação entre o perfil molecular α e sensibilidade e o perfil molecular β e resistência a antimicrobianos. A análise estatística mostrou que as variáveis perfil de sensibilidade e perfil molecular estão relacionadas e que a força desta relação calculada pelo coeficiente de Yule foi de 81,46% (nível de confiança 99%). A probabilidade destes perfis serem independentes é de 0,000969%. Anton e colaboradores (2001) realizaram uma análise semelhante utilizando estirpes de *E. coli* causadoras de pielonefrites complicadas e não complicadas. Os resultados encontrados mostraram que há uma associação entre o grupo molecular α e o perfil de sensibilidade a antimicrobianos, em concordância com nossos dados. Entretanto, as estirpes resistentes analisadas por estes autores mostraram uma distribuição ao acaso dentro dos grupos moleculares, diferente do que foi demonstrado neste trabalho, que relacionada de maneira estatisticamente significativa o perfil de resistência a antimicrobianos e o grupo molecular β . O grupo de bactérias em estudo neste trabalho é de origem ambulatorial e não foi realizada uma avaliação com relação ao tipo de infecção causada. Estas diferenças de metodologia podem explicar as discrepâncias encontradas na análise dos dois trabalhos.

TABELA V

Relação entre o tipo molecular e o perfil de sensibilidade

	α (n=8)	β (n=27)	Total (n=35)
Xilose +	08 (100%)	26 (96%)	34 (97%)
Rafinose +	00 (0%)*	19 (70%)*	19 (54%)
Sacarose +	04 (50%)*	19 (70%)*	23 (66%)
Ornitina +	08 (100%)*	12 (44%)*	20 (57%)

*dados estatisticamente significativos (nível de confiança 99%)

Dentre as estirpes resistentes pertencentes ao grupo molecular α , podemos destacar 3 características que ocorreram em concordância: incapacidade de utilização de rafinose e sacarose e capacidade de utilização de ornitina. (Tabela 5). A análise do crescimento em rafinose mostrou que 46% das estirpes resistentes e 92% das sensíveis foram incapazes de utilizá-la. A análise estatística mostrou que o perfil molecular α está relacionado à incapacidade de crescimento em rafinose e que o perfil β está relacionado positivamente a esta característica. A probabilidade destes perfis serem independentes foi de 0,0000022% (Tabelas 5 e 6). Estes dados estão em concordância com os encontrados por Garcia-Martinez e colaboradores (1996) que encontraram uma frequência de 95% de estirpes α negativas para rafinose, e 52% de estirpes β positivas. Os resultados em porcentagem determinados em nosso trabalho foram de 100% e 59% respectivamente.

TABELA VI

Relação entre o tipo molecular e o perfil de sensibilidade

	α (n=29)	β (n=10)	Total (n=39)
Xilose +	22 (76%)	10 (100%)	32 (82%)
Rafinose +	00 (0%)*	03 (30%)*	03 (7%)
Sacarose +	08 (27%)*	06 (60%)*	14 (36%)
Ornitina +	20 (69%)*	06 (60%)*	26 (67%)

*dados estatisticamente significativos (nível de confiança 99%)

O perfil de crescimento de sacarose mostrou que 68% das estirpes α foram negativas e que 68% das estirpes β foram positivas. Estes dados estão estatisticamente relacionados e a força desta relação foi de -62,55%. A probabilidade destes perfis serem independentes é de 0,2507%. Garcia-Martinez e colaboradores (1996) encontraram proporções semelhantes e concordantes com este trabalho.

O perfil de crescimento em ornitina somente foi relevante para caracterizar a população de estirpes resistentes do tipo α , na qual 100% das amostras foram positivas. A análise estatística evidenciou correlação entre o perfil molecular e o crescimento em ornitina. A força calculada desta relação foi de 58,56% e a probabilidade destes perfis serem independentes é de 0,79%. As estirpes do tipo molecular α estão relacionadas ao positivo e as do tipo β ao negativo. Este dado não havia sido descrito ou discutido anteriormente por outros autores.

CONCLUSÕES

- Existe uma correlação estatisticamente significativa entre o perfil molecular α e sensibilidade e o perfil molecular β e resistência a antimicrobianos;
- O perfil molecular α está relacionado à incapacidade de crescimento em rafinose e o perfil β está relacionado positivamente a esta característica;
- O perfil de crescimento de sacarose mostrou que existe uma correlação entre as estirpes do tipo α e incapacidade de utilização deste açúcar;
- As estirpes do tipo molecular α estão relacionadas positivamente ao crescimento em ornitina e as do tipo β ao negativo;

FINANCIAMENTO

Projeto financiado pelo Artigo 170 do Estado de Santa Catarina e desenvolvido na UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

AGRADECIMENTOS

Ao Setor de Microbiologia do Laboratório Médico Santa Luzia (Florianópolis-SC) pela concessão das estirpes e suas respectivas características bioquímicas e de resistência.

REFERÊNCIAS

- ANTON A. I. et al. Sequence microdiversity at the ribosomal RNA operons of *Escherichia coli* pyelonephritogenic strains. *Clinical Microbiology and Infection* v. 7 n. 7, p.345-51, 2001.
- BÖTTGER, E. C. Approaches for identification of microorganisms. *ASM News*, v. 62, n. 5, p. 247-250, 1996.
- GARCIA-MARTINEZ, J., MARTÍNEZ-MURCIA, A., RODRIGEZ-VALERA, F. ZORRAQUINO, A. Molecular evidence supporting the existence of two major groups in uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.14, p.231-244, 1996b.
- GARCIA-MARTINEZ, J., MARTÍNEZ-MURCIA, A., ANTÓN, I., RODRIGEZ-VALERA, F. Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons of some *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K12. *J. Bacteriol.*, v. 178, p. 6374-6377, 1996.
- GÜRTLER, V., MAYALL, B. C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 51, p. 3-16, 2001.
- HAMPL, V. PAVLICEK, A., FLEGR, J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program Free-Tree: application to trichomonad parasites. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.51, p.731-735, 2001.
- KUNIN, C.M. Urinary tract infections: detection, prevention, and management, 5. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997.
- MARANGONI, K.V., SOARES, R.P., MOREIRA, B.M. 1998 Infecções do trato urinário. In: Doenças infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica. p. 425-455 2ed Guanabara Koogan
- OLIVE, D. M. and BEAN, P. J. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Clin. Microbiol.*, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Universidade do Vale do Itajaí
Núcleo de Investigação Químico-Farmacêutica - NiqFar
Rua Uruguai, 341
CEP 88300-000 - Itajaí-SC
Fone: (0XX47) 33417664
E-mail: darlene@univali.br

IFCC WorldLab 2008

20th International Congress of Clinical Chemistry
35^o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8^o Congresso Brasileiro de Citologia Clínica



28 de setembro a 02 de outubro 2008
Fortaleza - CE - Brasil



Sociedade
Brasileira de
Análises
Clínicas

A SBAC facilita para você ir ao maior congresso mundial de Análises Clínicas.

Promoção de Aniversário
Inscrições a R\$ 400,00 até 31 de março.
Corra e aproveite!

Maiores informações:
21 2187-0800 - geral@sbac.org.br - www.sbac.org.br

Candida sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais

Candida sp. and nosocomial infections: epidemiological and laboratory aspects

Maria Eduarda Maluche¹ & Jairo Ivo dos Santos²

RESUMO - Infecções hospitalares fúngicas constituem uma causa crescente de morbidade e mortalidade em hospitais em todo mundo, afetando tanto a pacientes internados, como a profissionais de saúde. Do ponto de vista etiológico, a grande maioria das infecções hospitalares fúngicas é causada por espécies do gênero *Candida*, principalmente *Candida. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Sua identificação taxonômica geralmente exige o seu isolamento inicial em meios de cultura, a realização de provas bioquímicas de assimilação *in vitro*, com a utilização de "kits" comerciais, ou seu repique em meios cromogênicos. Para estudos epidemiológicos, métodos mais refinados que visam à análise do perfil genético de amostras isoladas, como "RAPD" ("Random Amplified Polymorphic DNA"), "PFGE" ("Pulse Field Gel Electrophoresis") e "RFLP" ("Restriction Fragment Length Polymorphism") fornecem ferramentas importantes para se determinar a origem comum de cepas pertencentes à mesma espécie de *Candida*, permitindo que sejam tomadas medidas profiláticas mais adequadas.

PALAVRAS-CHAVE - Classificação, Métodos epidemiológicos, *Candida*, Infecções Nosocomiais.

SUMMARY - Nosocomial fungal infections constitute an increasing cause of morbidity and mortality all over the world, affecting the health not only for the patients, but also for the professional staff. Most fungal infections acquired in the hospitals are caused by species of the genus *Candida*, mainly *Candida. albicans*, *parapsilosis*, *tropicalis* and *glabrata*. For their taxonomic identification, the samples need to be additionally tested by carbohydrate assimilation *in vitro* or chromogenic media from commercial sources. For epidemiological studies, molecular methods that are focused on the evaluation of DNA profiles, such as RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) are increasingly being used as useful tools for the determination of the common origin of strains of *Candida* species, through the demonstration of their genetic relatedness, thus allowing the adoption of adequate prophylactic measures.

KEYWORDS - Classification, Epidemiologic Methods, *Candida*, Cross-infection.

INTRODUÇÃO

Infecções hospitalares compreendem infecções causadas principalmente por bactérias e fungos e que são adquiridas por pacientes ou mesmo profissionais de saúde no ambiente hospitalar, constituindo uma causa crescente de morbidade e mortalidade em hospitais de todo o mundo, com prevalências tão altas quanto 30% em determinados grupos de pacientes¹⁵. No Brasil, embora os dados sejam incompletos, estima-se que elas sejam responsáveis por cerca de 45.000 óbitos e prejuízos da ordem de bilhões de reais anualmente²⁶.

As infecções hospitalares causadas por fungos têm-se constituído num problema crescente de saúde pública em muitos países. Por exemplo, nos Estados Unidos, a prevalência de infecções fúngicas passou de 6% em 1980 para 10,4% em 1990, segundo o Sistema Nacional de Vigilância das Infecções Hospitalares daquele país². Destas, cerca de 80% foram causadas por leveduras do gênero *Candida*. Por outro lado, esse mesmo sistema de vigilância relatou que no período de 1989 a 1999 houve aumentos significativos nas prevalências das infecções causadas por *Candida albicans* e *glabrata*^{17,40}.

FATORES QUE FAVORECEM A INFECÇÃO POR LEVEDURAS NO HOSPITAL

Vários processos patológicos, fisiológicos ou traumáticos podem facilitar a colonização e posterior infecção do hospedeiro por *Candida* sp. Dentre estes, os mais comuns são imunossupressão por várias causas, neutropenia, desnutrição e quimioterapia antineoplásica^{20,32}. Outros facilitam a entrada do microorganismo no hospedeiro, como o uso prolongado de catéteres, queimaduras e cirurgias extensas^{18,41}. Porém, fatores combinados também podem ocorrer, como a utilização prolongada de catéteres associados à antibioti-

coterapia, nos quais as leveduras podem multiplicar-se no trato gastrointestinal ou pele. A partir daí, o fungo pode disseminar-se para a corrente sanguínea, levando a um processo grave denominado de candidemia^{7,11,12,13,14}. Outra manifestação comum da colonização ou infecção por *Candida* em pacientes internados é a candidúria, definida pela presença de leveduras na urina¹⁶. Embora na maioria dos casos ela seja assintomática, resultante apenas de simples colonização do trato urinário, a candidúria pode ser um indício de processos infecciosos mais graves no rim, que, quando decorrentes de disseminação hematogênica das leveduras para este órgão, podem causar lesões graves com alta morbidade e mortalidade^{16,21,46}.

ESPÉCIES DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* no AMBIENTE HOSPITALAR

Do ponto de vista taxonômico, cerca de 200 espécies de *Candida* são reconhecidas, das quais 10% podem causar infecções em seres humanos⁴⁵. Destas, a *C. albicans* é espécie mais frequentemente descrita em casos de infecções hospitalares em vários países. Entretanto, outras espécies como *parapsilosis*, *tropicalis* e *glabrata* também apresentam altas prevalências em vários países do mundo, conforme é mostrado na Tabela 1^{32,36,44}. Estudos semelhantes realizados no Brasil mostram que as espécies mais prevalentes são *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Tabela 2)^{11,19}. *C. albicans*, espécie habitual do trato gastrointestinal, genital e cutâneo dos seres humanos, é transmitida quase sempre de forma endógena, geralmente em pacientes que tenham recebido quimioterapia prévia⁷. A espécie *C. parapsilosis* é encontrada frequentemente na pele, sendo de transmissão predominantemente exógena⁴. Sua ocorrência também é alta em crianças e recém-nascidos prematuros internados em unidades de terapia intensi-

Recebido em 22/01/2007

Aprovado em 26/12/2007

¹Mestranda do Curso de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC

²Professor Adjunto do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC

va^{6,27}. Os fatores de risco associados a sua transmissão são a nutrição parenteral e uso prolongado de catéteres^{6,7,38}.

C. tropicalis apresenta uma alta prevalência em casos de candidemia no Brasil e no mundo. O seu mecanismo de transmissão é essencialmente endógeno⁷. Considera-se que 50 a 60% dos pacientes colonizados por esta espécie desenvolvam infecções sistêmicas¹³. Esta espécie acomete com frequência pacientes neutropênicos, que apresentam como doenças de base neoplasias e doenças hematológicas ou que sejam receptores de medula óssea^{22,24}.

C. glabrata constituiu-se na quarta causa de infecção hospitalar fúngica por leveduras no Brasil, embora seja relatada com menor frequência em nosso país do que na Europa ou nos Estados Unidos e Canadá^{1,11,17,18,34}. Esta espécie está associada tanto a casos de candidemia em pacientes mais idosos quanto em casos de candidúria^{18,35}. Além disso, esta espécie desenvolve resistência à terapêutica pelo fluconazol com frequência¹³.

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida*

As espécies do gênero *Candida* geralmente podem ser cultivadas em meios de composição relativamente simples como o ágar Sabouraud dextrosado, desenvolvendo colônias com aspecto característico²³. Testes laboratoriais simples como indução de tubo germinativo e clamidósporo terminal permitem identificar *C. albicans*²³. Entretanto, eles apresentam limitações, já que a espécie *C. dubliniensis*, apresenta características fenotípicas muito semelhantes a *C. albicans*, exigindo a realização de procedimentos moleculares mais refinados para a sua diferenciação segura^{25,28}. Os meios cromogênicos foram descritos tanto para identificação de algumas espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans*. Dentre estes, estão disponíveis no mercado o CHROMagar®, que permite a identificação presuntiva de *C. albicans* (*C. dubliniensis*) e *C. tropicalis* e *C. krusei*, com base nas características de cor das colônias³³, assim como *Albicans* ID®, *Chromalbicans* Agar®, *Bactiscard Candida*®. Para identificação taxonômica de espécies não-*albicans* de *Candida*, de maneira geral, os isolados devem ser submetidos a provas bioquímicas de assimilação de açúcares *in vitro*. Dentre testes comerciais de assimilação *in vitro*, como Vitek®, ID 32C®, Api 20C AUX9®, Auxacolor Yeast Star®, RapID Yeast Plus system® and Api Candida®⁴². Entretanto, estes testes comerciais podem apresentar erros na identificação^{5,42}.

Métodos moleculares que visam à identificação de seqüências específicas para cada espécie e assim permitir a sua identificação, também têm sido relatados. Nestes procedimentos, fragmentos genômicos de DNA fúngico são amplificados e testados com oligonucleotídeos específicos, permitindo identificar espécies comuns como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, and *C. Lusitaniae*^{30,43}.

VARIAÇÃO INTRA-ESPECÍFICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida*

Espécies do gênero *Candida* apresentam variações na sua composição genômica que podem ser determinadas por procedimentos de análise genômica⁴⁰. Estes procedimentos são úteis quando se quer determinar a identidade da cepa presente no ambiente hospitalar ou que tenha isolada de pacientes internados, e assim associá-las aos processos infecciosos. Com base nos resultados obtidos, isolados de uma mesma espécie com perfis genéticos idênticos, obtidos de diferentes pacientes podem indicar um mecanismo de transmissão comum^{31,39}.

Muitas técnicas moleculares usadas para a tipagem de microrganismos baseiam-se na separação eletroforética de fragmentos ou moléculas de DNA que diferem em tamanho e/ou número, entre as quais as mais comuns são a análise de fragmentos de DNA gerados por digestão com endonucleases de restrição e separados por eletroforese em géis de agarose ("RFLP")^{9,29}, cariotipagem de cromossomas separados por eletroforese de campo pulsado ("PFGE")^{10,29,37}, e de produtos genômicos gerados pela amplificação aleatória de DNA através da cadeia de polimerase ("RAPD")^{9,11,29}. Estas técnicas são freqüentemente combinadas com a transferência eletroforética de DNA para membranas de celulose e posterior hibridização com oligonucleotídeos específicos para determinar o polimorfismo genético da amostra^{3,10}.

TABELA I
Percentagem de espécies de *Candida* identificadas em casos de candidemia em vários países do mundo.

	Estudos realizados (autores)		
	WING GARD (1995) (44)	REX <i>et al.</i> (1994) (36)	PFALLER (1996) (32)
<i>C. albicans</i>	54,0%	56,0%	59,0%
<i>C. tropicalis</i>	25,0%	17,0%	12,0%
<i>C. glabrata</i>	8,0%	13,0%	11,0%
<i>C. parapsilosis</i>	7,0%	10,0%	10,0%
<i>C. krusei</i>	4,0%	2,0%	3,0%
Outras espécies	2,0%	2,0%	3,0%

TABELA II
Frequência das espécies de *Candida* observados em casos de candidemia no Brasil, de acordo com vários autores.

	Estudos realizados (autores)		
	COLOMBO <i>et al.</i> (1999) (11)	ANTUNES <i>et al.</i> (2004) (1)	GODOY <i>et al.</i> (2003) (19)
<i>C. albicans</i>	37,0%	48,3%	42,0%
<i>C. parapsilosis</i>	25,0%	25,8%	21,3%
<i>C. tropicalis</i>	24,0%	13,3%	24,2%
<i>C. glabrata</i>	4,0%	3,3%	7,7%
<i>C. guilliermondii</i>	2,0%	1,7%	2,9%
Outras espécies	3,0%	7,5%	1,9%

CONCLUSÕES

O aumento da prevalência e da ocorrência de leveduras do gênero *Candida* e de outros gêneros em ambientes hospitalares, torna-se um fator adicional de risco à saúde dos pacientes internados ou dos profissionais e visitantes. Assim, justifica-se plenamente que sejam desenvolvidos e utilizados procedimentos técnicos mais rápidos e precisos para a identificação taxonômica das amostras fúngicas, para que o tratamento dos pacientes infectados seja iniciado na maior brevidade possível. Por outro lado, o desenvolvimento de métodos laboratoriais mais refinados para o estudo e comparação do perfil genético das amostras de *Candida* isoladas, permitirá que espécies deste gênero, isoladas de pacientes internados sejam comparadas com aquelas isoladas de outros pacientes, de profissionais de saúde, equipamentos ou do próprio ambiente hospitalar, permitindo assim a identificação da fonte da infecção com segurança, e possibilitando a adoção de medidas profiláticas ou terapêuticas mais eficazes.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, A. G. V.; PASQUALOTTO, A. C.; DIAZ, M. C.; D'AZEVEDO, P. A.; SEVERO, L. C. Candidemia in a Brazilian Tertiary care Hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 46, n. 5, p. 239-241, 2004.
- BECK-SAGUÉ, M. C.; JARVIS, W. R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections. *J. Infect. Dis.*, v. 167, n. 5, p. 1247-1251, 1993.
- BOCCIA, S.; POSTERARO, B.; LA SORDA, M.; et al. Genotypic analysis by 27A DNA fingerprinting of *Candida albicans* strains isolated during an outbreak in a neonatal intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v. 23, n. 5, p. 281-284, 2002.
- BONASSOLI, L. A.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T. I. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J. Hosp. Infect.*, v. 59, n. 2, p. 159-162, 2005.
- CAMPBELL, C. K.; DAVEY, K. G.; HOLMES, A. D.; SZEKELY, A.; WARNOCK, D. W. Comparison of the API *Candida* system with the AUXACOLOR system for identification of common yeast pathogens. *J. Clin. Microbiol.*, v. 37, n. 3, p. 821-823, 1999.
- CANO, M.V.; PERZ, J. F.; CRAIG, A. S.; et al. Candidemia in pediatric outpatients receiving home total parenteral nutrition. *Med. Mycol.*, v. 43, n. 3, p. 219-225, 2005.
- CANTÓN, E.; VIUDES, A.; PEMÁN, J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Rev. Iberoam. Micol.*, v. 18, n. 2, p. 51-55, 2001.
- CARDENES, C. D.; CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; ARIAS, A.; et al. Comparative evaluation of four commercial tests for presumptive identification of *Candida albicans*. *J. Microbiol. Methods*, v. 59, n. 2, p. 293-297, 2004.
- CHOWDHARY, A.; BECKER, K.; FEGELER, W.; et al. An outbreak of candidemia due to *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit. *Mycoses*, v. 46, n. 8, p. 287-292, 2003.
- CLARK, T.; SLAVINSKI, S. A.; MORGAN, J.; et al. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infection in a community hospital. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, n. 10, p. 4468-4472, 2004.
- COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian Tertiary Care Hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 34, n. 4, p. 281-286, 1999.
- COLOMBO, A.L. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian perspective. *Braz J Infect. Dis.*, v. 4, n. 3, p. 113-118, 2000.
- COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.
- COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUËR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.
- CRAVEN, D.E.; KUNCHES, L. M.; LICHTENBERG, D. A.; et al. Nosocomial infection and fatality in medical and surgical intensive care unit patients. *Arch. Intern. Med.*, v. 148, n. 5, p. 1161-1168, 1998.
- DE OLIVEIRA, R.D.R.; MAFFEI, C.M.L.; MARTINEZ, R. Infecção urinária hospitalar por levaduras do gênero *Candida*. *Rev. Ass. Med. Brasil*, v. 47, n. 3, p. 231-235, 2001.
- FIDEL, P.L.; VAZQUEEZ, J.A.; SOBEL, J.D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 12, n. 1, p. 80-96, 1999.
- FRIDKIN, S.K.; JARVIS, W.R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 9, n. 4, p. 499-511, 1996.
- GODOY, P.; TIRABOSCHI, I.N.; SEVERO, L. C.; et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 3, p. 401-405, 2003.
- JARVIS, W.R. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. *Clin. Infect. Dis.*, v. 20, n. 6, p. 1526-1530, 1995.
- KAUFFMAN, C.A.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D.; et al. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. *Clin Infect Dis*, v. 30, n. 1, p. 14-18, 2000.
- KONTOPYANNIS, D.; VAZIRI, I.; HANNA, H. A.; et al. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in adult patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.*, v. 33, n. 10, p. 1676-1681, 2001.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E.; MELO, N. T. Tratado de Micologia Médica – Lacaz. São Paulo, SP: Sarvier, p. 123-173, 2002.
- LEUNG, A.Y.; CHIM, C. S.; HO, P. L.; et al. *Candida tropicalis* fungemia in adult patients with haematological malignancies: clinical features and risk factors. *J. Hosp. Infect.*, v. 50, n. 4, p. 316-319, 2002.
- MAHNSS, B.; STEHR, F.; SCHÄFER, W.; NEUBER, K. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*, v. 48, n. 1, p.55-61, 2005.
- MALUF, M.E.Z.; MALDONADO, A. F.; BERCIAL, M. E.; PEDROSO, S. A. Stethoscope: a friend or an enemy? *São Paulo Med. J.*, v. 120, n. 1, p. 13-15, 2002.
- MATSUMOTO, F. E.; GANDRA, R. F.; RUIZ, L. S.; et al. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of Sao Paulo, Brazil. *Mycopathologia*, v. 154, n. 2, p. 63-69, 2002.
- MCCULLOUGH, M. J.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 37, n. 2, p. 417-421, 1999.
- MEHTA, S.K.; STEVENS, D. A.; MISHRA, S. K.; FERROZE, F.; PIERSON, D.L. Distribution of *Candida albicans* genotypes among family members. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 34, n. 1, p. 19-25, 1999.
- MORACE, G.; SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; CASCIO, G. L.; FADDA, G. Identification of various medically important *Candida* species by PCR-restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, n. 3, p. 667-672, 1997.
- PFALLER, M.A. Epidemiology and control of fungal infections. *Clin. Infect. Dis.*, v. 19, suppl.1, p. S8-13, 1994.
- PFALLER, M.A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin. Infect. Dis.*, v. 22, suppl. 2, p. S89-94, 1996.
- PFALLER, M.A.; HOUSTON, A.; COFFMANN, S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 34, n. 1, p. 58-61, 1996.
- PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY program. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, n. 7, p. 1886-1889, 1998.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 10, p. 3551-3557, 2002.
- REX, J.H.; BENNETT, J.E.; SUGAR, A.M. A randomized trial comparing fluconazol with amphotericin B for the treatment of candidemia of patients without neutropenia. *N. Engl. J. Med.*, v. 331, n. 20, p. 1325-1330, 1994.
- RHO, J.; SHIN, J. H.; SONG, J. W.; et al. Molecular investigation of two consecutive nosocomial clusters of *Candida tropicalis* candiduria using pulse-field gel electrophoresis. *J. Microbiol.*, v. 42, n. 2, p. 80-86, 2004.
- SAN MIGUEL, L.G.; COBO, J.; OTHEO, E.; et al. Secular trends of candidemia in a large tertiary-care hospital from 1988 to 2000: emergence of *Candida parapsilosis*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v. 26, n. 6, p. 548-552, 2005.
- TAYLOR, B.N.; HARRER, T.; PSCHIEDL, E.; et al. Surveillance of nosocomial transmission of *Candida albicans* in an intensive care unit by DNA fingerprinting. *J. Hosp. Infect.*, v. 55, n. 4, p. 283-289, 2003.
- TRICK, W.E.; SCHONIAN, G.; MEYER, W.; et al. Secular trend of Hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin. Inf. Dis.*, v. 3, n. 5, p. 627-630, 2002.
- VAZQUEZ, J.A.; SANCHEZ, V.; DMUCHOWSKI, C.; et al. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiology study. *J. Infect. Dis.*, v. 168, n. 1, p. 195-201, 1993.
- VERWEIJ, P.E.; BREUKER, I. M.; RIJUS, A. J.; MEIS, J. F. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *J. Clin. Pathol.*, v. 52, n. 4, p. 271-273, 1999.
- WAHYUNINGSIH, R.; FREISLEBEN, H. J.; SONNTAG, H. G.; SCHNITZLER, P. Simple and Rapid Detection of *Candida albicans* DNA in Serum by PCR for Diagnosis of Invasive Candidiasis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, n. 8, p. 3016-3021, 2000.
- WINGARD, J.R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin. Infect. Dis.*, v. 20, n. 1, p. 115-125, 1995.
- YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. IN: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The yeasts, a taxonomic study*. New York, Elsevier, 1998.
- ZAOUTIS, T.E.; ARGON, J.; CHU, J.; BERLIN, J. A.; WALSH, T. J.; FEUDTNER, C. The Epidemiology and Attributable Outcomes of Candidemia in Adults and Children Hospitalized in the United States: A Propensity Analysis. *Clin. Infect. Dis.*, v.41, n.9, p. 1232-1239, 2005

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Jairo Ivo dos Santos

Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde,

Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário

CEP. 88040-970 Florianópolis, Santa Catarina

Tel: 0XX48 3331-9856

E-mail: jairosantos@ccs.ufsc.br

PRÊMIO HERMES PARDINI DE HORMONOLOGIA REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC, com o patrocínio do Instituto Hermes Pardini;
- 2) O Prêmio será no valor de R\$ 5.000,00 (cinco mil reais), além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

O Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia tem por objetivos;

- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Hormônios no País; e
- 2) Premiar o melhor trabalho de hormonologia inscrito e apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem word) e uma cópia em disquete (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado na íntegra, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia, obrigatoriamente, deve ser apresentado na sessão de Temas Livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos do prêmio, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2006.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia
Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • 20270-902 • Rio de Janeiro • RJ

A citopatologia uretral como ferramenta na detecção de efeito citopático do papilomavírus humano (HPV) em pacientes com peniscopia característica de infecção viral*

The role of urethral cytopathology in detection of cytopatic features of Human Papillomavirus (HPV) in patients with peniscopy characteristic of viral infection

Heliana de Araújo Silva¹; Luiz Mário da Silva Silveira¹; Glauciene Serafim França² & Ailce de Cássia Soares Santos Rego²

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da citopatologia uretral na detecção de papilomavírus humano em 37 pacientes diagnosticados com lesões HPV-induzidas pela peniscopia, na Policlínica Santa Beatriz (São Luís - MA). Avaliou-se a ocorrência das diferentes faixas etárias, a positividade para efeito citopático por HPV pela citopatologia uretral comparado com a peniscopia e a associação dos resultados obtidos quando a parceira era portadora da virose. A faixa etária mais freqüente estava compreendida entre 20 e 39 anos (86,5%) com média de idade de 31,2. A citopatologia uretral apresentou positividade para a virose de 13,5%. Todos os pacientes com citopatologia uretral com efeito citopático compatível para HPV tinham parceiras com história anterior de HPV, porém 40,6% dos pacientes com citopatologias uretrais negativas possuíam parceiras com história anterior de HPV.

PALAVRAS-CHAVE - Papilomavírus humano; citopatologia uretral; peniscopia.

SUMMARY - The goal of this work was to assess the efficiency of urethral cytopathology in detection of human papillomavirus (HPV) carried out in 37 male patients attended at Clínica Santa Beatriz (São Luís-MA) with previous positive peniscopy for HPV. We evaluated the positiveness of urethral cytopathology compared with peniscopy in different band age and the influence of the partner in the transmission of the disease. The most frequent age was between 20 to 39 years (86.5%), with age average of 31.2%. Urethral cytopathology presented positiveness for cytopatic effects in 13.5% of the cases. All males evaluated with positive cytopatic effect for HPV had partner with previous HPV diagnosis, although 40.6% of the subjects presented negative urethral cytopathology.

KEYWORDS - Human papillomavirus; urethral cytopathology; peniscopy.

INTRODUÇÃO

No final do século XX observou-se em todo o mundo mudanças no comportamento sexual e com isso surgiram novas doenças sexualmente transmissíveis como a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e outras de importância até então secundária que, pelo aumento da incidência, despertaram o interesse em seu estudo, como a condilomatose genital².

Na verdade, tem-se conhecimento de verrugas genitais desde a época greco-romana, onde atribuíam a transmissão da doença por contato homossexual. O termo condiloma adotado nesse tempo permanece até os dias atuais⁴. O interesse pelo estudo do Papilomavírus humano (HPV) aumentou na década de 80, em proporção similar à incidência das alterações por ele induzidas nas mulheres, o que despertou o interesse também pelos parceiros sexuais das mesmas. Comprovou-se que mulheres de parceiros promíscuos, ou de mulheres de parceiros cuja esposa anterior tivesse falecido de câncer do colo uterino, pertenciam ao grupo de grande risco para infecção por HPV e também para câncer do colo uterino².

Virchow, em 1867, descreveu os condilomas como sendo pequenas elevações na superfície, semelhantes à couve-flor. Na Alemanha, esses condilomas foram divididos em duas espécies: acuminado (papilas pontiagudas ou grânulos), e plano, na forma úmida, também conhecida como "verruca maldita"².

A partir de 1976, através da caracterização cito-histológica da infecção cervical por Meisels e Fortin e, sobretudo, os trabalhos desenvolvidos por Purolo e Savia, os estudos e pesquisas permitiram acumular grande volume de conhecimento sobre a estrutura e a organização genética do HPV, os métodos de diagnóstico e de detecção virótica, o tratamento e a relação com o câncer. Todavia, permanecia

hiato de cooperação e entendimento entre estudiosos do vírus no laboratório e o clínico na prática ambulatorial^{14, 15}. O conhecimento das lesões subclínicas cervicais e vaginais originou a investigação de lesões semelhantes na genitália masculina e em outras partes da genitália feminina onde se utilizou o colposcópico para esta finalidade, possibilitando o surgimento da peniscopia, vulvoscopia e anoscopia, sendo assim descritas as lesões subclínicas do pênis, da vulva e do ânus¹¹. A atenção na avaliação dos parceiros teve seu marco em 1982, quando Baggish observou 22% de parceiros de pacientes com condiloma apresentando lesões clínicas¹⁵. Entre a população sexualmente ativa, a infecção genital pelo papilomavírus humano é atualmente a doença sexualmente transmissível (DST) viral mais freqüente⁴. Estima-se que cerca de 10 a 20% da população adulta sexualmente ativa tenha infecção pelo HPV, embora apenas 1% apresente o condiloma clássico, e 2%, lesões visíveis somente após aplicação do ácido acético (doença subclínica). Segundo dados populacionais do IBGE e aplicando a projeção da literatura mundial estima-se que no Brasil haja de 3 a 6 milhões de homens infectados pelo HPV¹¹. Respeitando-se as diferenças populacionais e metodológicas, a prevalência do DNA-HPV no sexo masculino tem sido descrita entre 3,6 e 84%. Os maiores índices (63 - 84%) foram detectados em homens freqüentadores de clínicas de DST⁴. As lesões causadas pelo HPV, no homem, podem afetar o trato geniturinário desde a genitália externa até o trato urinário superior e a região perianal. Entretanto, concentra-se freqüentemente no pênis, na região do prepúcio interno (60 a 90%), no corpo (8 a 55%) e na glande (1 a 20%), sendo encontrado ainda no escroto entre 5 a 20% dos casos⁵. A uretra é um reservatório natural para o HPV. A infecção uretral ocorre mais freqüentemente nos 2 cm distais, incluindo a fossa navicular. Pode apresentar-se clinicamente como mácula ou verruca que se exterioriza pelo meato¹².

Recebido em 31/01/2007

Aprovado em 18/02/2008

*Trabalho realizado na Policlínica Santa Beatriz (São Luís-MA).

¹Professores do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). ²Farmacêutica-Bioquímica.

As lesões HPV-induzidas na bexiga são raras podendo ser confundidas com tumor de células transicionais da bexiga. Pode manifestar-se por hematúria e sintomas irritativos vesicais. É mais freqüente no sexo feminino e em indivíduos imunodeprimidos. O comprometimento do ureter pelo HPV é extremamente raro e de difícil diagnóstico⁴.

A incidência de câncer de pênis é menor do que o de câncer cervical, com diferença significativa entre as duas. A zona de transformação do colo é altamente suscetível a malignização, contrariamente ao epitélio peniano. A ausência da "terceira mucosa" no pênis dificultaria a ação de mutágenos coadjuvantes na carcinogênese. Outra explicação seria o fato de o pênis ser estrutura externa, em contato direto e permanente com o ambiente, não estando sujeito aos mesmos co-fatores ativos cervicais, havendo também maior facilidade de higiene, além de ser mais precoce a terapêutica das infecções¹⁴.

Embora o câncer de colo uterino e o peniano apresentem clara associação com o papilomavírus humano, outros locais genitourinários estão expostos a esse agente sexualmente transmissível e também podem ser vulneráveis à oncogênese viral. Considerando os fatos mencionados realizou-se um estudo comparativo entre os resultados encontrados de pacientes que realizaram a citopatologia uretral e que tinham previamente se submetido à peniscopia com resultado apresentando lesões HPV-induzidas.

METODOLOGIA

A população estudada constituiu-se de pacientes do sexo masculino atendidos na Policlínica Santa Beatriz, São Luís – MA, que haviam apresentado lesões HPV-induzidas pela peniscopia. Foram coletados dados de resultados de citopatologia uretral de 37 pacientes. Com relação à história clínica, verificou-se se a parceira possuía ou não HPV diagnosticado. Serviu como critério de inclusão no estudo homens que possuíam parceiras fixas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A infecção por HPV é a doença sexualmente transmissível que mais tem provocado preocupação quanto à gênese de câncer anogenital em homens e, sobretudo, em mulheres¹⁶. Desde a identificação do HPV e os esforços na elucidação de seu papel na etiopatogênese de lesões cervicais, a literatura tem fartamente documentado a possível influência de agentes/co-fatores envolvidos na alta incidência de lesões cervicais em mulheres e seus parceiros^{3, 7, 20}.

A incidência de câncer de pênis é baixa quando comparada ao câncer cervical¹⁷. No entanto, cresce o interesse na detecção de HPV em pacientes do sexo masculino, devido a importância que o mesmo exerce como fonte de contaminação de suas parceiras.

Neste trabalho foram avaliados 37 pacientes do sexo masculino atendidos na Clínica Santa Beatriz que realizaram citopatologia uretral e que apresentavam lesões HPV-induzidas ao exame peniscópico. Estes pacientes encontravam-se na faixa etária de 19 a 60 anos, média de 31,2 anos (Tabela 1). A peniscopia é uma ferramenta diagnóstica que vem sendo utilizada para a detecção de infecção por HPV com muita freqüência, dado os achados típicos que este exame oferece tornando o laudo consistente com essa infecção. No presente estudo a peniscopia se utilizou dos achados típicos consistentes com diagnóstico de HPV. Estes dados serviram como parâmetro para comparação com a citopatologia uretral.

As faixas etárias mais acometidas dos homens submetidos à peniscopia que apresentaram lesões HPV-induzidas foi de 20 a 29 anos (59,5%) e 30 a 39 anos (27,0%).

A viabilidade da peniscopia para o encontro de efeitos HPV-induzidos se deve possivelmente pela utilização do ácido acético e o azul de toluidina conjuntamente, o que

aumenta as chances de percepção das lesões. O ácido acético provoca a vasoconstrição, coagulação temporária de proteínas, conferindo a coloração branca em áreas ricas em proteínas. O azul de toluidina, por ser um corante vital, impregna somente células ricas em proteínas¹⁰.

A pesquisa de infecção por HPV na uretra de homens tem-se revelado de grande importância, uma vez que tem aumentado as evidências de que um reservatório uretral pode ser responsável por infecções novas ou recorrentes, já que lesões nesse local não são percebidas ou mesmo detectadas¹⁶.

Dos 37 pacientes analisados, 5 (13,5%) apresentaram alterações morfológicas compatíveis com infecção por HPV na citopatologia uretral, sendo que as freqüências ficaram distribuídas entre 20-49 anos (Tabela 2). Dores e Nicolau⁶ e Nicolau *et al.*¹⁸, em trabalhos envolvendo a pesquisa de HPV por captura híbrida em várias partes do pênis, encontraram a taxa de 30% de material obtido da uretra distal. Estes autores relataram maior freqüência de achados de HPV em material obtido do prepúcio (38%). No entanto, há de se destacar que a técnica HPV-DNA tem maior especificidade para a detecção da infecção virótica, visto que a citologia baseia-se na observação de alterações celulares provocadas pelo vírus. Todavia, Teixeira *et al.*¹⁹ encontraram citopatologia uretral compatível para HPV somente em 4,2% dos casos examinados.

Os dados mostrados nas tabelas anteriores demonstram que a citopatologia uretral é um método limitado, visto que as lesões HPV-induzidas não se restringem apenas à uretra. De outro modo, a citologia é um meio de diagnóstico indireto, onde se pesquisa alterações morfológicas induzidas pelo vírus em nível celular. Deve-se ressaltar, ainda, que pelo fato das alterações celulares serem discretas, estas podem passar despercebidas pelo profissional, devendo este ficar bastante atento às alterações presentes no esfregaço.

A baixa freqüência de relatos de infecções por HPV pode ser devido ao fato de que os homens podem albergar o vírus na uretra, próstata ou vesículas seminais sem qualquer evidência clínica da doença¹³.

Quanto à associação entre a citopatologia uretral e a peniscopia, observou-se concordância de positividade em lesões induzidas por HPV em 13,5% dos casos, enquanto 86,5% dos casos não apresentaram efeitos citopáticos para HPV no exame citopatológico.

O Ministério da Saúde preconiza a idéia dos dois métodos de diagnóstico serem realizados concomitantemente, visto que tanto a citopatologia uretral quanto a peniscopia são capazes de sugerir a presença de lesões HPV-induzidas na forma clínica e subclínica da infecção, e no caso de citologia duvidosa o exame peniscópico pode complementar seu diagnóstico. Esta conduta visa impedir a utilização de medida demasiada invasiva, como a biópsia, como único objetivo diagnóstico, visto que a freqüência de lesões pré-invasivas é muito baixa na genitália masculina.

Neste trabalho verificou-se se houve influência no fato da parceira do paciente ser portadora do condiloma em relação ao diagnóstico citológico e peniscópico. Dos cinco casos diagnosticados pela citopatologia uretral como tendo efeitos citopáticos HPV-induzidos, todas as parceiras apresentaram diagnóstico anterior de HPV; todavia, verificou-se que entre os pacientes que não apresentaram sinais citológicos para HPV na citopatologia uretral (32 casos), 40,6% tinham parceiras com história prévia de infecção pelo HPV (Figura 1). Em relação à peniscopia, observou-se que do total de pacientes avaliados apresentando lesões HPV-induzidas por este método, 73,0% destes apresentavam parceiras com história anterior de diagnóstico de HPV (dados não tabulados). Apesar de 23,0% das parceiras não apresentarem história prévia de HPV, os dados encontrados concordam com a literatura, porque esta refere que as lesões HPV-induzidas

em homens diagnosticados pela peniscopia correspondem em maior frequência aqueles cujas parceiras apresentam a patologia². Em contrapartida, relata-se que o contato sexual não produz verrugas genitais em todos os casos, ficando a transmissão do vírus dependente da imunidade celular ou outros fatores locais⁴. Além do mais, há de se considerar o fato que a parceira não diagnosticada como portadora do HPV verdadeiramente não o possui, já que a infecção pode ser clínica, subclínica ou latente.

Quanto à transmissibilidade de HPV ao parceiro, Frega *et al.*⁹ relataram que parceiros de mulheres afetadas por lesões escamosas de baixo grau apresentaram maior prevalência de HPV, em comparação a parceiros de mulheres com lesão de alto grau.

A citopatologia cérvico-vaginal vem sendo utilizada em mulheres e tem-se mostrado eficiente não somente na prevenção, mas também no diagnóstico do HPV. Em homens, a citopatologia uretral ainda não é rotina, devido principalmente a baixa prevalência de câncer de pênis. Todavia, como a uretra pode servir como reservatório de agentes sexualmente transmissíveis, inclusive o HPV, torna-se necessário a utilização de metodologia para triagem que fosse de fácil realização, baixo custo e não invasiva.

Neste trabalho, a citopatologia uretral mostrou baixa associação com a peniscopia, sendo observada alterações citopáticas para HPV em somente 13,5% dos casos. Aynaud *et al.*¹ encontraram alterações citológicas sugerindo infecção por HPV em 81% dos homens apresentando lesões uretrais, embora tenha ocorrido citologia positiva para HPV em 15% dos homens sem lesões uretrais. Nossos resultados e dados da literatura têm demonstrado que a citopatologia uretral não é específica e o seu uso como ferramenta de screening pode levar a um elevado número de resultados falso-negativos.

Essas observações sugerem que homens assintomáticos que se submetem a screening para HPV que têm uma história, lesões subclínicas ou lesões HPV-induzidas perimeatal ou meatal grosseiramente visíveis devem se submeter adicionalmente à peniscopia ou à uretroscopia⁸, visto que a citopatologia uretral não é um teste indicado ou de custo-benefício para a detecção de HPV uretral.

TABELA I

Faixa etária dos pacientes submetidos à citopatologia uretral e peniscopia (Clínica Santa Beatriz, São Luís - MA).

Faixa etária	n	%
< 20	1	2,7
20 - 29	17	45,9
30 - 39	14	37,8
40 - 49	4	10,8
50 - 59	1	2,7
> 59	-	-
Tot al	37	100,0

TABELA II

Distribuição quanto a faixa etária e o diagnóstico compatível ou não com HPV dos pacientes submetidos à citopatologia uretral (Clínica Santa Beatriz, São Luís - MA).

Faixa etária	Diagnóstico			
	Com HPV		Sem HPV	
	n	%	n	%
< 20	-	-	1	2,7
20 - 29	2	5,4	15	40,5
30 - 39	2	5,4	12	32,4
40 - 49	1	2,7	3	8,1
50 - 59	-	-	1	2,7
> 59	-	-	-	-
Tot al	05	13,5	32	86,5

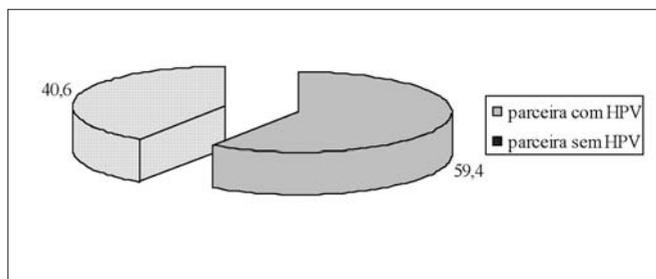


Figura 1. Distribuição (%) quanto à citopatologia uretral sem sinais citopáticos para HPV e história prévia de HPV da parceira (Clínica Santa Beatriz, São Luís - MA).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio do corpo técnico da Clínica Santa Beatriz.

REFERÊNCIAS

- Aynaud, O; Ionesco, M; Barrasso, R. Cytologic detection of human papilloma-virus DNA in normal male urethral samples. *Urology*, 61(6):1098-1101, 2003.
- Bibbo, M.; Moraes Filho, A. Lesões relacionadas à infecção por HPV no tra-to anogenital. *Fio de Janeiro: Revinter*, 1998.
- Buonaguro, F.M.; Tornesello, M.L.; Salatiello, I.; Okong, P.; Buonaguro, L.; Beth-Giraldo, E.; Biryahwaho, B.; Sempala, S.D.; Giraldo, G. The Uganda study on HPV variants and genital cancers. *Journal of Clinical Virology*, 19:31-41, 2000.
- Carvalho, J.J.; Oyakawa, N.I. Congresso brasileiro de HPV (Papilomavírus humano). São Paulo: BG Cultural, 2000.
- Condiloma acuminado - HPV. Disponível em: <http://www.dst.com.br/pag05.htm>. Acesso em 10/11/2006.
- Dores, G. B.; Nicolau, S. M. Utilidade Clínica da Biologia Molecular no Diag-nóstico do HPV no Homem. Disponível em: http://www.digene.com.br/men-u/biblioteca/texto_publicacao.asp?doc=337. Acesso em: 18/12/2006.
- Dürst, M.; Gissman, L.; Ikenberg, H.; zur Hausen, H. A Papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 3812-5, 1983.
- Fralick, R.A.; Malek, R.S.; Goellner, J.R.; Hyland, K.M. Urethroscopy and urethral cytology in men with external genital condyloma. *Urology*, 43(3): 361-4, 1994.
- Frega, A.; Stentella, P.; Villani, C.; Di Ruzza, D.; Marcomin, G.L.; Rota, F.; Boninfante, M.; Pachi, A. Correlation between cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus male infections: a longitudinal study. *European Journal of Gynaecologic Oncology*, 20(3): 228-30, 1999.
- Gil, A. O. Peniscopia como método diagnóstico da infecção pelo Papiloma-vírus humano genital. *Jornal Brasileiro de Urologia*, 24: 93-97, 1998.
- HPV e lesões genitais. <http://www.ipog.com.br/historico.htm>. Acesso em 08/01/2005.
- Infecção pelo Papilomavírus humano (HPV). <http://www.ipog.com.br/histo-rico.htm>. Acesso em 08/01/2005.
- Koronel, R; Stefanon, B. Pilotti, S.; Bandieramonte, G.; Rilke, F.; De Palo, G. Genital human papillomavirus infection in males. A clinic pathologic study. *Tumori*, 77(1): 76-82, 1991.
- Jacyntho, C. HPV - O vírus do câncer pelo sexo? Nossas dúvidas. Rio de Janeiro; Editora do Autor, 2001.
- Jacyntho, C.; Almeida, G.; Maldonado, P. HPV - Infecção genital feminina e masculina. Rio de Janeiro: Revinter, 1994.
- Levine, L.A.; Elterman, L.; Rukstalis, D. Treatment of subclinical intraurethral pap-illoma virus infection with interferon alfa-2B. *Urology*, 47(4): 553-557, 1996.
- Melbye, M.; Frisch, M. The hole of human papillomavirus in anogenital can-cer. *Cancer Biology*, 8: 307-13, 1998.
- Nicolau, S.M.; Camargo, C.G.C.; Stávale, J.N.; Gallo, C.; Dôres, G.B.; Lö-rincz, A. Hibrid capture in the detection of HPV-DNA in male sexual partners of women with genital infection. Final results. In: 19th International Papillo-mavirus Conference. Florianópolis, 2001.
- Teixeira, J.C.; Santos, C.C.; Derchain, S.F.M.; Zeferino, L.C. Lesões induzi-das por papilomavírus humano em parceiros de mulheres com neoplasia in-traepitelial do trato genital inferior. *Revista Brasileira de Ginecologia*, 21(8): 431-437, 1999.
- Ter Meulen, J.; Eberhardt, H.C.; Luande, J.; Mgaya, H.N.; Chang-Claude, J.; Mtiro, H.; Mhina, M.; Kashajia, P.; Ockert, S.; Yu, X. Human papillomavirus (HPV) infection, HIV infection and cervical cancer in Tanzania, east Africa. *International Journal of Cancer*, 51: 515-21, 1992.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Luiz Mario da Silva Silveira
 Dep. de Farmácia - UFMA
 Rua 02 Q 05 C-5 Residencial Itaguara II, Cohatrac
 CEP. 65050-100 S. Luís - MA

PRÊMIO NEWPROV

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio NEWPROV é promovido pela **Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC**, com o patrocínio da NEWPROV PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a R\$ 2.000,00 dois mil reais, na data da outorga, além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

- O Prêmio NEWPROV tem por objetivos;
- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Microbiologia no País; e
 - 2) Premiar o melhor trabalho sobre Microbiologia inscrito e apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (uniterms) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio NEWPROV poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio NEWPROV, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio NEWPROV é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio NEWPROV obrigatoriamente, deve ser apresentado na sessão de Temas livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio NEWPROV

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • 20270-902 • Rio de Janeiro • RJ

Manutenção de leveduras por congelamento a -20°C

Yeasts maintenance for freezing at -20°C

Jaqueline Otero SILVA, Patrícia Pereira COSTA & Sílvia Helena Chinarelli RECHE

RESUMO - As coleções de culturas são especialmente úteis para estudos retrospectivos e prospectivos, que enfocam a biologia, etiologia e aspectos epidemiológicos. Uma vez que estes estudos, geralmente, demandam um longo período de tempo, é importante que se faça escolha adequada do método de preservação. O total de 328 leveduras representadas pelos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rodothorulla* foram semeadas em caldo cérebro-coração contendo glicerol e após 7 dias de refrigeração, congeladas a -20°C. Foram recuperadas 99,0% das leveduras após 3 anos e 3 anos e 6 meses de congelamento. Após o período de 4 anos, a viabilidade foi de 90,6% (144 leveduras). A metodologia ofereceu a vantagem de baixo custo, facilidade na realização e no armazenamento além de favorecer a conservação de quase totalidade das leveduras por 42 meses.

PALAVRAS-CHAVE - Congelamento, Leveduras, Manutenção.

SUMMARY - The culture collections are especially useful for retrospective and prospective studies, which focus the biology, etiology and epidemic aspects. Once these studies, generally, demand a long period of time, it is important to do the adequate choice of preservation method. The total of 328 yeasts represented by the genus *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rodothorulla* were seeded in brain-heart infusion containing glycerol and after 7 days of refrigeration, frozen at -20°C. It was recovered 99,0% of yeasts after 3 years and 3 years and 6 months of freezing. After the period of 4 years the viability was 90,6% (144 yeasts). The methodology offered the low cost advantage, easiness in the accomplishment and in the storage, besides offering the conservation of almost the totality of yeasts for 42 months.

KEYWORDS - Freezing Methods, yeasts, Maintenance

INTRODUÇÃO

O aumento da incidência das doenças imunossupressoras assim como o uso de antimicrobiano de amplo espectro e melhora nos métodos diagnósticos, tem resultado no crescimento dos números de casos de infecções fúngicas causadas por leveduras, principalmente do gênero *Candida*. Com isso, estes organismos se tornaram alvo de muitas pesquisas com diversas finalidades como: o estudo da resistência, virulência, tipagens moleculares, entre outros, sendo mantidos e manipulados em laboratórios científicos. Neste contexto, as coleções de fungos, denominadas micotecas, são especialmente úteis para estudos retrospectivos e prospectivos, que enfoquem a biologia, etiologia e aspectos epidemiológicos. Uma vez que estes estudos geralmente demandam um longo período de tempo, é importante que se faça a escolha adequada do método de preservação. Na escolha de um método devemos considerar a capacidade de manutenção das características fenotípicas, genotípicas e patogênicas das cepas estocadas (GIRÃO *et al.* 2004; MARIANO, 2006). As leveduras podem ser mantidas pela transferência serial para meios de culturas frescos. Este método, embora simples é laborioso, consome um tempo relativamente grande, além de ser economicamente inadequado, sendo útil apenas para coleções de cultura não muito numerosas, destinadas ao uso na rotina (SMITH, 1991).

Ao longo dos anos, vários métodos de preservação têm sido desenvolvidos, visando à eliminação dos problemas encontrados em transferências seriadas (ASHCAR *et al.*, 1988; GIRÃO *et al.* 2004; HOFFMANN, 1999; KWON - CHUNG e BENNETT, 1991; ODDS, 1991; RODRIGUES *et al.*, 1992). O principal objetivo da preservação de culturas é a extensão do tempo de sobrevivência das cepas armazenadas. Métodos que têm apresentado maior sucesso são aqueles que reduzem o metabolismo a ponto de induzir latência artificial. Isso pode ser conseguido através da desidratação ou congelamento, onde se utiliza meios pobres para o desenvolvimento dos fungos, incubando-se em baixas temperaturas ou em baixa tensão de oxigênio (GENTLES e SCOTT, 1979; KIRSOP e SNELK, 1984).

O presente trabalho tem como objetivo, avaliar a viabilidade de leveduras conservadas a -20°C em três diferentes períodos de tempo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: Foram avaliadas 328 leveduras representadas pelo gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rodothorulla*, isoladas de diferentes materiais biológicos humanos e identificadas segundo a metodologia clássica (KURTZMAN e FELL, 1998).

Congelamento: As leveduras, após repique de 48 horas em Agar de Sabouraud, foram semeadas em caldo infusão cérebro-coração com 20% de glicerol, distribuídos previamente em flaconetes contendo miçangas e incubados 30°C por 48 horas. A seguir os flaconetes foram mantidos sob refrigeração por 7 dias, e posteriormente, estocados em freezer a -20°C. Os períodos de congelamento e descongelamento estão representados na Tabela 1.

Viabilidade: Para verificar a viabilidade das cepas, as miçangas foram pressionadas na superfície do agar e, a seguir, as placas foram incubadas a 30°C por 48 horas.

RESULTADOS

Foram recuperadas 99,0% das cepas referentes aos períodos de 3 anos e 3 anos e 6 meses de congelamento. Após 4 anos de congelamento, a viabilidade foi de 90,6% (144 cepas). A Tabela 2 representa as espécies de leveduras preservadas nos três períodos de tempo.

TABELA I
Período de congelamento e descongelamento das 328 cepas de leveduras

Tempo de congelamento	Nº de cepas	Congelamento	Descongelamento
3 anos	73	Janeiro/2001	Janeiro/2004
3 anos e 6 meses	96	Novembro/2000	Maió/2004
4 anos	146	Junho/2000	Junho/2004
	13	Fevereiro/2002	Fevereiro/2006

Recebido em 29/03/2007

Aprovado em 14/12/2007

Instituto Adolfo Lutz- Laboratório I de Ribeirão Preto

TABELA II
Total de espécies de leveduras conservadas a -20°C, em três diferentes períodos de tempo:

ESPÉCIES	TEMPO DE CONGELAMENTO		
	3 anos (N ^o cepas congeladas/N ^o cepas viáveis)	3 anos e 6 meses (N ^o cepas congeladas/N ^o cepas viáveis)	4 anos (N ^o cepas congeladas/N ^o cepas viáveis)
<i>C. albicans</i>	73/72	61/60	94
<i>C. parapsilosis</i>	-	16/16	26/26
<i>C. glabrata</i>	-	8/8	9/9
<i>C. tropicalis</i>	-	5/5	-
<i>C. guilliermondii</i>	-	4/4	4/4
<i>C. krusei</i>	-	2/2	2/2
<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	-	13/13
<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	4/4
<i>Rodhotorula</i> sp.	-	-	7/7
Total de cepas	73	96	159

DISCUSSÃO

As leveduras são organismos unicelulares que podem ser manipuladas em laboratórios de forma semelhante à maioria das bactérias, mas com exigências nutricionais e ambientais normalmente mais simples. Em geral, são microrganismos fáceis de manter, estocar, cultivar e isolar a partir de diferentes materiais biológicos. Embora elas sejam tolerantes a condições desfavoráveis, muitos métodos de manutenção, comumente utilizados, resultam em baixos níveis de sobrevivência e instabilidade das suas propriedades fisiológicas e bioquímicas (MARIANO, 2006).

Os métodos tradicionais de conservação de leveduras (ex: repiques sucessivos em ágar de Sabouraud) requer muitos cuidados, pois consomem rapidamente o meio de cultura, necessitando de repiques frequentes gastando tempo e possibilitando a contaminação por fungos ambientais, presença de ácaros, além de poder alterar as características morfológicas e fisiológicas, culminando com a morte do microrganismo.

Processos de desidratação ou congelamento são os melhores métodos de preservação de culturas de fungos, pois baseiam-se na redução do metabolismo celular até um nível de dormência artificial, além de anular o risco de contaminação por ácaros (COSTA e FERREIRA, 1991; STOCKDALE *et al.* 1989). Neste estudo, os resultados de viabilidade de culturas congeladas em BHI adicionado de 20% de glicerol em flaconetes com miçangas comprovam a alta eficiência do processo, pois 99% das leveduras apresentaram-se viáveis por até 3 anos e 6 meses. Segundo STOCKDALE *et al.* (1989), a sobrevivência de fungos depende da temperatura e período de armazenamento sendo que o estoque em freezer a -20°C pode torná-las viáveis por 4 a 5 anos. No entanto, a formação de cristais de gelo pode alterar a sobrevivência quando em temperaturas menores. A eficiência de crioprotetores para contornar este problema, tem sido demonstrada por vários autores (ALCARD e BASSO, 1997; COSTA e FERREIRA, 1991; KIRSOP e SNELL, 1984).

Segundo SPENCER e SPENCER (1996), o glicerol funciona como crioprotetor e deve ser adicionado de forma a se chegar a concentrações finais que podem variar entre 15 e 50%. Estudos demonstram que o congelamento a -70°C é um excelente método na manutenção da maioria dos fungos de importância médica, no entanto, o equipamento a -80°C nem sempre está disponível nos laboratórios (PASARELL e MCGINNIS, 1992). CRESPO *et al.* (2000) avaliaram diferentes métodos para preservação de *Malassezia* spp. sendo que o congelamento a -80°C manteve 100% das leveduras.

Após 4 anos de congelamento, 90,6% das cepas foram recuperadas sendo que 100% dos *Cryptococcus neoformans* foram viáveis. NERY *et al.* (2001) avaliaram três métodos de congelamento da levedura *Cryptococcus neoformans* e encontraram melhores resultados, recuperando 100% das culturas, quando conservadas por 4 meses a -20°C em BHI adicionado de glicerol. Eles enfatizam que a refrigeração de 2 a 8°C, anterior ao congelamento das culturas, impede que ocorra diferenças drásticas de temperatura evitando choque térmico. O presente estudo demonstrou que o congelamento de amostras a -20°C contendo o crioprotetor glicerol, após a refrigeração entre 2 a 8°C, pode ser uma técnica alternativa para conservação das leveduras pois, recuperou-se a quase totalidade das cepas no período de 3 anos e 6 meses. A metodologia também ofereceu a vantagem de baixo custo, facilidade na realização e no armazenamento com a utilização de flaconetes.

REFERÊNCIAS

- ALCARD, A.R.; BASSO, L. C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. *Sci Agric*; 54 (3), 1997. Available from ? <http://www.sicielo.br/sicielo.php>?
- ASHCAR, H.; PAULA, C. R.; PETROCINI, V. R. Manutenção de fungos por processo de liofilização após período prolongado de tempo - 34 anos. *Rev Microbiol*; 19(4): 422-424, 1988.
- COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. *Rev Microbiol*; 22(3): 263-268, 1991.
- CRESPO, M. J.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. *J Clin Microbiol*; 38(10): 3872-3875; 2000.
- DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.; PIRES, C. M. Preservação de fungos em água destilada. *Anais Bras Dermatol*; 80(6):591-594; 2005.
- GENTLES, J. C.; SCOTT, E. The preservation of medically important fungi. *Sabouraudia*; 17: 415-418; 1979.
- GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. *Rev Soc Bras de Med Trop*; 37(3):229-233; 2004.
- HOFFMANN, P. Cryopreservation of fungi. *W J Microbiol Biotech*; 7:92-94; 1999.
- KIRSOP, B. E.; SNELL, J.J.S. Maintenance of microorganisms, A manual of Laboratory Methods. London: Academic Press Inc; 1984.
- KURTZMAN, P. C.; FELL, J. W. The yeasts: a taxonomic study. 4 Ed. Amsterdam: Elsevier; 1998, 1055 p.
- KWON - CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991. p. 44-71.
- MARIANO, P. L. S. Diferentes processos de armazenamento de leveduras; estudos sobre a variabilidade fenotípica e genotípica. Doutorado em Microbiologia e Imunologia. p. 120 Piracicaba Universidade Estadual Campinas Faculdade de Odontologia de Piracicaba em Biologia Muco Dental; 2006.
- NERY, S. A.; MELHEM, M. S. C.; GOMES, A. M. L. Manutenção da levedura *Cryptococcus* sp por congelamento. *Laes & Haes*; 129: 194-198; 2001.
- ODDS, F. C. Long- term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*; 29: 413-415; 1991.
- PASARELL, L.; MCGINNIS, M. R. Viability of fungal cultures maintenance at - 700C. *Journal of Clinical Microbiology*; 30(4): 1000-1004; 1992.
- RODRIGUES, E. G.; LÍRIO, V. S.; LACAZ, C. S. Preservação de fungos e actinomicetos de Interesse médico em água destilada. *Rev Inst Méd Trop S Paulo*; 34(2):159-165; 1992.
- SMITH, D. Maintenance of filamentous fungi. In: Kirsop BE & Doyle A. Maintenance of microorganisms and culture cells. London, Academic Press, 1991. p.134-159
- SPENCER, J. F.; SPENCER, D.M. Maintenance and culture of yeasts. *Methods Mol Biol*; 53:5-15; 1996.
- STOCKDALE, P.M.; SMITH, D.; CAMPBELL, C.K. The maintenance and preservation of fungi. In: Evans, EGV e Richardson MD. *Medical Mycology: a practical approach*. Oxford, IRL PRESS, Oxford University Press. 1989.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dra Jaqueline Otero Silva.
 Rua Minas 877, Campos Elíseos
 CEP. 14085-410 Ribeirão Preto, SP
 Tel: 55 16 3625-5046; Fax 55 16 3635-7994
 E-mail:jaquelineos@ig.com.br



PROGRAMA CIENTÍFICO

Domingo 28 de Setembro de 2008

18.00 – 20.00 - **Auditório**
CERIMÔNIA DE ABERTURA

Segunda, 29 de Setembro de 2008

09.00 – 09.45 - **Auditório**

PALESTRA PLENÁRIA: O Sistema Proteolítico da Ubiquitina: Mecanismos Básicos e Associações com Doenças
Prof. Aaron Chiechanover - Prêmio Nobel 2004 em Medicina

Centro de Pesquisas em Biologia Vasculare e Tumores – The Rappoport Faculty of Medicine and Research Institute - Haifa, Israel

10.00 – 12.30 - **Auditório**

SESSÕES PARALELAS - O Laboratório no Diabetes e Prediabetes

Presidente: Geraldo Picheth (Brasil)

Marcadores biológicos para avaliar controle glicêmico no diabetes mellitus - *E.S. Kilpatrick (Reino Unido)*

Genética do Diabetes tipo 2 - *T.H. Lindner (Alemanha)*

Modificações pós-tradução de proteínas no Diabetes - *P. Gillery (França)*

Diabetes e Pré-diabetes: Atualização laboratorial e novas perspectivas diagnósticas - *D.E. Bruns (EUA)*

10.00 – 12.30 - **Sala A**

SESSÕES PARALELAS - Bases Moleculares da Medicina e o Laboratório Clínico

Presidente: Paolo Fortina (EUA)

Perfil Molecular do Câncer de Cólon - *F. Barany (EUA)*

Análise de SNP e Sequenciamento de DNA baseados em cargas moleculares intrínsecas - *Y. Miyahara (Japão)*

Testes moleculares para diagnóstico de câncer e seleção de terapia - *Walter H. Koch ()*

Progresso no diagnóstico molecular de doenças síndromicas Hirschsprung e outras neurocristopatias - *M. Goossens (França)*

10.00 – 12.30 - **Sala B**

SESSÕES PARALELAS - Doença de Chagas: diversidade do parasito e diagnóstico

Presidente: Alejandro Luquetti (Brasil)

Diversidade genética do *Trypanosoma cruzi* e implicações epidemiológicas - *B. Zingales (Brasil)*

Diagnóstico molecular da Doença de Chagas - *O. Fernandes (Brasil)*

Novos métodos para o diagnóstico sorológico - *M. Peralta (Brasil)*

Transmissão do *Trypanosoma cruzi* por via transfusional e por transplante de órgãos em áreas não endêmicas - *G. Schmuñis (EUA)*

10.00 – 12.30 - **Sala C**

SESSÕES PARALELAS - O Conceito de Rastreabilidade na Medicina Laboratorial - Uma Ferramenta para Padronização

Presidente: L. Siekmann (Alemanha)

A estratégia para a implementação da rastreabilidade baseada nos padrões relevantes ISO - *J.C. Forest ()*

The Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine – Um enfoque global para aprovar sistemas de referência - *M. Muller (Áustria)*

Requisitos para laboratórios de referência - *L. Siekmann ()*

Padronização da HbA1c através da introdução do conceito de rastreabilidade - *A. Mosca ()*

Conceitos para a padronização das dosagens dos marcadores cardíacos - *M. Panteghini ()*

10.00 – 12.30 - **Sala D**

SESSÕES PARALELAS - Qualidade Analítica

Presidente: Daniel Mazziotta (Argentina)

Qualidade analítica em hemostasia - *C. Duboscq (Argentina)*

Qualidade analítica em hematologia - *N. Fink (Argentina)*

Rastreabilidade e incerteza: responsabilidades da indústria de IVD - *J. Gella (Espanha)*

Padronização analítica: situação na América Latina - *D. Mazziotta (Argentina)*

12.45 – 17.30 – **Sala B e Sala D** - Workshops patrocinados pelas indústrias

15.30 – 17.30 - **Auditório**

SESSÕES PARALELAS - Medicina Laboratorial baseada em Evidência

Presidente: Gerard Sanders (Países Baixos)

- O que é Medicina Laboratorial Baseada em Evidência e como aplicá-la - *A. R. Horvath (Hungria)*
- Revisões sistemáticas que justificam a Medicina Laboratorial baseada em Evidência - *K. Khan (Reino Unido)*
- Medicina baseada em Evidência na cardiologia. A abordagem do estudo de caso - *R. Christenson (EUA)*

15.30 – 17.30 - **Sala A**

SESSÕES PARALELAS - Aspectos Nutricionais em Medicina Laboratorial

Presidente: Shwu-Bin-Lin (Taiwan)

- Avaliação Laboratorial do Status Nutricional – Onde está a Evidência? - *D.E. Palmer-Toy (EUA)*
- Laboratório de Obesidade – da bancada à beira do leito - *K.C. Huang (Taiwan)*
- Deteção e possível significado fisiológico do CEHC, o metabólito da vitamina E - *C-J Huang (Taiwan)*

15.30 – 17.30 - **Sala C** - Simpósio a ser definido

15.30 – 17.30 - **Sala E**

SESSÕES PARALELAS – Garantia da Qualidade em Tecnologias Novas

Presidente: Ian Young (Reino Unido)

- Garantia da qualidade em testes genéticos moleculares - *F. Rousseau (Canadá)*
- Controle de qualidade e padronização em metabóloma - *O. Fiehn (EUA)*
- Controle de qualidade e garantia da qualidade em testes de microarray - *L. Kricka (EUA)*

Terça, 30 de Setembro de 2008

09.00 – 09.45 - **Auditório**

PALESTRA PLENÁRIA: O impacto da biologia molecular no campo das doenças tropicais

Prof. Jorge Kalil - Diretor do Laboratório de Imunologia - Instituto para Investigação em Imunologia, São Paulo, Brasil

10.00 – 12.30 - **Auditório**

SESSÕES PARALELAS - Proteômica

Presidente: Denis Hochstrasser (Suíça)

- Entendendo o Proteoma Humano - *M. Wilkins (Austrália)*
- Um Atlas da Proteína Humana de Tecidos Normais e Câncer - *M. Uhlen (Suécia)*
- Descoberta de Biomarcadores Plasmáticos e O Atlas Peptídico - *R. Aebersold (Suíça)*
- Proteômica e Bioquímica Clínica - *D. Hochstrasser (Suíça)*

10.00 – 12.30 - **Sala A**

SESSÕES PARALELAS - Imunologia Clínica: Alergia e Autoimunidade – Novos conceitos da bancada ao leito do paciente

Presidente: Harald Renz (Alemanha)

- Aumento do número de casos de alergia e autoimunidade: O que podemos aprender sobre a hipótese da higiene? - *H. Renz (Alemanha)*
- Avanços no diagnóstico da alergia: da IgE ao teste celular - *C. Lam (Hong Kong)*
- Valor diagnóstico da triagem e testes específicos para anticorpos antinucleares - *L.E. Andrade (Brasil)*
- Quimiocinas e receptores de quimiocinas: nova perspectiva de marcadores inflamatórios - *M.M. Corsi (Itália)*

10.00 – 12.30 - **Sala B**

SESSÕES PARALELAS - Doenças Tropicais nas Américas – Epidemiologia e Abordagem Laboratorial

Presidente: Carlos Graeff Teixeira (Brasil)

- Ferramentas diagnósticas e medidas de controle em filariose linfática - *G. Fontes (Brasil)*
- Malária: o microscópio e as novas ferramentas diagnósticas - *C.T.D. Ribeiro (Brasil)*
- Lagochilascariase: o papel do diagnóstico parasitológico e molecular - *Passos Barbosa (Brasil)*
- Ferramentas de alta sensibilidade para diagnóstico da esquistossomose em áreas de baixa endemicidade e medicina do viajante - *C. Graeff Teixeira (Brasil)*

10.00 – 12.30 - **Sala C**

SESSÕES PARALELAS - Medicina Laboratorial e Osteoporose

Presidente: Andréa Griesmacher (Áustria)

- Marcadores Bioquímicos de Remodelação Óssea: Diagnóstico na Prática Clínica - *A. Griesmacher (Áustria)*
- Utilidade dos Marcadores de Remodelação Óssea para a Prevenção e Diagnóstico Precoce da Osteoporose - *M.J. Seibel (Austrália)*
- Epidemiologia da Osteoporose e seu impacto no diagnóstico - *H. Schmidt-Gayk (Alemanha)*
- Osteoprotegrina e Ativador de Receptor de NF- κ B, Novos Biomarcadores de Remodelação do Osso - *M. Shaarawy (Egito)*

10.00 – 12.30 - **Sala D**

SESSÕES PARALELAS - Trombofilia Adquirida e Genética

Presidente: Lucía C. Kordich (Argentina)

- O papel das plaquetas e dos produtos derivados das plaquetas na trombose arterial - *D. Mezzano (Chile)*
- Alterações na coagulação e na regulação da fibrinólise - *C. Duboscq (Argentina)*
- Trombofilia e alteração molecular - *J.M. Annichino-Bizzacchi (Brasil)*
- Síndrome Antifosfolípido - *Steffano de Perdomo (Uruguai)*

10.00 – 12.30 – **Sala E**

WORKSHOP – Evidência na Prática Laboratorial

Presidente: Rita Horvath (Hungria)

Presidente manhã: Sverre Sandberg (Noruega)

Introdução: Evidência em ação - *R. Christenson (EUA)*

Validação diagnóstica – este ensaio é clinicamente útil? - *C. Florkowski (Nova Zelândia)*

Usando testes de laboratório para monitoramento: Nós temos a evidência? - *R. Horvath (Hungria)*

O papel da evidência na comunicação dos resultados do laboratório com o clínico - *Peter Bunting (Canadá)*

Discussão

12.45 – 17.30 – **Sala B e Sala D** - Workshops patrocinados pelas indústrias

15.30 – 17.30 – **Auditório**

SESSÕES PARALELAS - Novas tendências no laboratório clínico

Presidente: Helene Anderson Svahn (Suécia)

Identificação de linfócitos T antígeno-específicos no diagnóstico e no monitoramento clínico - *A. Bonini (Itália)*

Miniaturização e aplicações clínicas - *A. Van Den Berg (Países Baixos)*

Análise de células isoladas - *H Andersson (Suécia)*

15.30 – 17.30 - **Sala A** - Simpósio a ser definido

15.30 – 17.30 – **Sala C**

SESSÕES PARALELAS - Medicina Preditiva: da teoria à prática

Presidente: Maurizio Ferrari (Itália)

Proteômica Clínica para a Predição do Câncer - *D.W. Chan (EUA)*

Farmacogenética: Passado, Presente e Futuro - *R.H.N. vanSchaik (Países Baixos)*

A agonia e o êxtase da genética preditiva - *M. Ferrari (Itália)*

15.30 – 17.30 – **Sala E**

WORKSHOP - Evidência na Prática Laboratorial

Presidente: Rita Horvath (Hungria)

Presidente Tarde: Rob Christenson (USA)

Evidência do benefício de testes preditivos: Farmacogenômica e medicina personalizada - *J. Whitfield (Austrália)*

Medicina baseada em evidência *versus* medicina baseada em orientação: semelhanças e diferenças - *J. Watine (França)*

Implementando recomendações orientadas pela evidência na prática - *S. Sandberg (Noruega)*

Discussão

Quarta, 1 de Outubro de 2008

09.00 – 09.45 - **Auditório**

PALESTRA PLENÁRIA: Bases Moleculares das doenças

Prof. Mathias Muller - Sociedade Austríaca de Garantia de Segurança e Padronização, Viena, Áustria.

10.00 – 12.30 - **Auditório**

SESSÕES PARALELAS - Marcadores cardíacos: presente e futuro (Parte I)

Presidente: Mauro Panteghini (Itália)

Questões relacionadas à medição da troponina cardíaca - *M. Panteghini (Itália)*

Troponina: o biomarcador de escolha para detecção de injúria miocárdica - *A. S. Jaffe (EUA)*

Marcadores emergentes da síndrome coronária aguda: além da troponina - *A. Heeschen (Alemanha)*

O valor dos marcadores cardíacos nas doenças cardíacas não isquêmicas - *J. P. Bertinchant (França)*

10.00 – 12.30 - **Sala A** - Simpósio a ser definido

10.00 – 12.30 - **Sala B**

SESSÕES PARALELAS - Diagnóstico molecular de doenças infecciosas

Presidente: Maria Ordália Ferro Barbosa (Brasil)

Abordagem pós-genômica do diagnóstico laboratorial da hanseníase - *M. Stefani (Brasil)*

Métodos moleculares aplicados ao diagnóstico e monitoramento da hepatite C - *J. R. Rebello Pinho (Brasil)*

Diagnóstico molecular da toxoplasmose: possibilidades e problemas - *O. Fernandes da Silva Filho (Brasil)*

Diagnóstico molecular da leishmaniose - *L. Campino (Portugal)*

10.00 – 12.30 - **Sala C**

SESSÕES PARALELAS - Aumento do emprego da espectrometria de massa - Queda do imunoensaio?

Presidente: Linda Thienpont (Bélgica)

Desenvolvimentos tecnológicos na espectrometria de massa direcionada ao multiplexing e análise de alto desempenho - *A ser anunciado*

Aumento do emprego da espectrometria de massa - Queda do imunoensaio? Ponto de vista de um fabricante de imunoensaio - *A ser anunciado*

Aumento da espectrometria de massa - Queda do imunoensaio? Ponto de vista de um fabricante de espectrometria de massa - *M. Morris (Manchester, Reino Unido)*

Aumento da espectrometria de massa - Queda do imunoensaio? Ponto de vista do laboratório clínico - *Rockwood (USA)*

10.00 – 12.30 - Sala D

SESSÕES PARALELAS - Questões em Micologia Médica

Presidente: Amadeo Javier Bava (Argentina)

- Técnicas moleculares aplicadas ao diagnóstico micológico - *M. Cuenca Estrella (Espanha)*
- Avanços no diagnóstico da paracoccidioidomicose - *Z. Pires de Camargo (Brasil)*
- Epidemiologia da Histoplasmose - *M. L. Taylor da Cunha e Mello (México)*
- Diagnóstico da pneumocistose pulmonar - *A. J. Bava (Argentina)*

12.45 – 15.30 - Sala B - Workshops patrocinados pelas indústrias

12.45 – 17.30 - Sala D - Workshops patrocinados pelas indústrias

15.30 – 17.30 - Auditório

SESSÕES PARALELAS - Marcadores cardíacos: presente e futuro (Parte II)

Presidente: Mauro Panteghini (Itália)

- Impacto das questões relacionadas aos ensaios de quantificação do peptídeo natriurético do tipo B - *J. Mair (Áustria)*
- Aplicações clínicas do teste do peptídeo natriurético do tipo B - *A. M. Richards (Nova Zelândia)*
- Biomarcadores de risco cardiovascular: onde devemos focar? - *M. McQueen (Canadá)*

15.30 – 17.30 - Sala A - Simpósio a ser definido

15.30 – 17.30 - Sala B

SESSÕES PARALELAS - Segulab (Segurança em Laboratório): Uma Colaboração Existente entre Brasil e Itália para um Bom Serviço Laboratorial Médico

Presidentes: Paulo Mocarelli (Itália), Ulisses Tuma (Brasil)

- O compromisso da SBAC (Sociedade Brasileira de Análises Clínicas) em Melhorar a Qualidade - *U. Tuma (Brasil)*
- O Projeto Segulab: Realizações e Perspectivas - *F. Dorigatti (Itália), L. Prencipe (Itália)*
- Melhorando a Qualidade e reduzindo erros na medicina laboratorial: aspectos científicos e éticos - *P. Bonini (Itália), G. Zoppei (Itália)*
- Valores de referência específicos para gênero/idade e influência do tempo de entrega de resultados do paciente: dois importantes componentes da qualidade em laboratórios clínicos - *F. Ceriotti (Itália), C. Franzini (Itália)*
- Discussão: Propostas e Perspectivas de Colaboração Internacional - *P. Mocarelli (Itália), U. Tuma (Brasil)*

15.30 – 17.30 - Sala C - Simpósio a ser definido

15.30 – 17.30 - Sala E

SESSÕES PARALELAS - Medicina Laboratorial em países em desenvolvimento: Questões e Desafios

Presidente: Renze Bais (Austrália)

- Medicina Laboratorial na Região da Federação Árabe de Biologia Clínica (AFCB): Prática Atual e Metas Futuras - *Al-Khatib (Síria)*
- O Desafio da Medicina Laboratorial na África - *V. Steenkamp (África do Sul)*
- Situação da Medicina Laboratorial na América Latina. Educação, Regulamentos e Necessidades - *A. L. Maselli (Guatemala)*
- Desafios e Problemas da Medicina Laboratorial na China - *F. Sun (China)*

Quinta, 2 de Outubro de 2008

09.00 – 09.45 - Auditório

PALESTRA PLENÁRIA: A ser definida

10.00 – 12.30 - Auditório

SESSÕES PARALELAS - O Laboratório Clínico e o Manejo do Paciente: Como eles se relacionam?

Presidente: Jocelyn M.B. Hicks (EUA)

- Planejamento Estratégico e Financeiro: Crítico para o Laboratório Clínico - *J. M. B. Hicks (EUA)*
- Minimizando erros do pedido médico à liberação do resultado - *D.S. Young (EUA)*
- Força de Trabalho e privatização dos Laboratórios Clínicos: Dois desafios para a próxima década - *I.C. Barnes (Reino Unido)*
- Caminhos Integrados: O papel do Laboratório Clínico - *M. Plebani (Itália)*

10.00 – 12.30 - Sala A

SESSÕES PARALELAS - Síndrome do stress: Conseqüências Fisiológicas e Bioquímicas no homem

Presidente: Oren Zinder (Israel)

- Vôo Espacial de Longa Duração: Síndrome do Stress Crônico - *J. MacDonald (EUA)*
- Resposta do Stress e Parâmetros Laboratoriais em Pacientes Criticamente Enfermos - *I. Vermes (Países Baixos)*
- Stress Oxidativo e Insuficiência Cardíaca - *I. Schimke (Berlim)*
- Regulação da Resposta do Stress por Esteróides Neuroativos - Amigos ou Inimigos? - *O. Zinder (Israel)*

10.00 – 12.30 - Sala B

SESSÕES PARALELAS - HIV-AIDS: Diagnóstico molecular, genotipagem e epidemiologia

Presidente: Marcelo Pilonetto (Brasil)

- O Uso da Biologia Molecular no diagnóstico da Infecção do HIV - *R. Sobhie Diaz (Brasil)*
- Genotipagem do HIV e sua aplicação - *B. Galvão-Castro (Brasil)*
- Epidemiologia do HIV/AIDS - *D.A. Bertolini (Brasil)*
- A experiência brasileira com genotipagem – A Rede de Genotipagem Nacional - *A ser anunciado*

10.00 – 12.30 - Sala C

SESSÕES PARALELAS - A relevância clínica da incerteza de medição: qualidade analítica e tomada de decisão clínica

Presidente: Ken Sikaris (Austrália)

Incerteza da medição: relevância para o entendimento da qualidade analítica - *K. Sikaris (Austrália)*

Definindo o impacto diagnóstico e de monitoramento do que o laboratório atinge como qualidade analítica - *P. Hyltoft (Dinamarca)*

Definindo o impacto clínico da qualidade do desempenho analítico do laboratório - *G. Klee (EUA)*

Além da qualidade analítica: A importância do controle de qualidade pós analítico para garantir o valor clínico - *G. Cembrowski (Canadá)*

10.00 – 12.30 - Sala D

SESSÕES PARALELAS - Imunofenotipagem de Leucemias e Linfomas

Presidente: A. Ruiz-Arguelles (México)

Recomendações da Segunda Conferência de Consenso Latino Americano para Imunofenotipagem de Malignidades Hematológicas por Citometria de Fluxo - *Ruiz-Arguelles (México)*

Novas contribuições da Imunofenotipagem Multiparamétrica por Citometria de Fluxo para o Diagnóstico das Leucemias Agudas e Crônicas - *A. Órfao (Espanha)*

Imunofenotipagem de Doenças Linfoproliferativas Crônicas - *R.E. Duque (EUA)*

Transplante de Células Troncos Hematopoiéticas para o Tratamento de Malignidades Hematológicas - *A. Madrigal (Reino Unido)*

10.00 – 12.30 - Sala E

WORKSHOP IFCC - Como estabelecer um sistema de qualidade de acordo com ISO 15189 (Parte I)

Presidente: Wim de Kieviet (Países Baixos)

Oradores convidados: E. Frank (Índia); H. Stekel (Áustria); L. Berte (USA) e D. Burnett (Reino Unido)

15.30 – 17.30 - Auditório

SESSÕES PARALELAS - Ácidos Nucléicos Circulantes como Nova Ferramenta de Diagnóstico Molecular

Presidente: Dennis Lo (China)

Ácidos nucleicos circulantes no plasma/soro: noções gerais e aplicabilidade como marcador de tumor - *D. Lo (China)*

Ácidos nucleicos fetais no plasma materno: o futuro do diagnóstico pré-natal não invasivo? - *C. Oudejans (Países Baixos)*

Ácidos nucleicos circulantes no plasma para o monitoramento de doenças agudas e crônicas - *R. Swaminathan (Reino Unido)*

12.45 – 17.30 - Sala B e Sala D - Workshops patrocinados pelas indústrias

15.30 – 17.30 - Sala A

SESSÕES PARALELAS - Medicina Laboratorial em Geriatria

Presidente: Yaping Tian (China)

Biomarcadores e proteômica nas desordens neurodegenerativas - *R. Ekman (Suécia)*

Abordagens não Invasivas em Estudos Metabólicos de Populações Idosas e Outras Vulneráveis - *Y-m Yu (EUA)*

A aplicação clínica do perfil proteômico sérico em população idosa - *Y. Tian (China)*

15.30 – 17.30 - Sala C

SESSÕES PARALELAS - Estudo da Hemostasia e o Laboratório Clínico

Presidente: Richard A. Marlar (EUA)

Testes para Trombofilia - *R. A. Marlar (EUA)*

Garantia da Qualidade e Controle da Qualidade no Laboratório de Coagulação - *S. Kitchen (Reino Unido)*

Diagnóstico de trombose induzida por anticorpo - *E. Lindhoff-Last (Alemanha)*

15.30 – 17.30 - Sala E

WORKSHOP IFCC - Como estabelecer um sistema de qualidade de acordo com ISO 15189 (Parte II)

Presidente: Wim de Kieviet (Países Baixos)

Oradores convidados: E. Frank (Índia); H. Stekel (Áustria); L. Berte (USA) e D. Burnett (Reino Unido)

17.30 – 18.00 - Auditório

CERIMÔNIA DE ENCERRAMENTO



*Vejo você em
Fortaleza!
No IFCC 2008!*

Somente quem entende do mercado pode lhe oferecer o que há de melhor.

Provedor de Ensaio de Proficiência nas Áreas de
Laboratórios Clínicos, Bancos de Sangue e
Organizações de Diagnóstico *In Vitro* e Alimentos



**Programa
Nacional de
Controle de
Qualidade**

PNCQ

Programa Nacional de Controle de Qualidade

Tel : [21] 2569-6867

www.pncq.org.br pncq@pncq.org.br

Acreditação de Sistema de Qualidade de
Laboratórios Clínicos e de Organizações
prestadoras de serviços de saúde.



**Sistema
Nacional de
Acreditação**

DICQ

DICQ Sistema Nacional de Acreditação

Tel [21] 2187-0822

www.dicq.org.br acreditacao@dicq.org.br



ABNT/CB-36
**Comitê Brasileiro de Análises
Clínicas e Diagnóstico In Vitro**



Comitê Mercosul de Normalização
Comitê Setorial Mercosul de
Análises Clínicas e Diagnóstico *In Vitro*

TEAC
Título de Especialista
em Análises Clínicas



QualineWS

O Portal de Conhecimento das Análises Clínicas

Jornal SBAC

GLAC
Gestor de Laboratórios
de Análises Clínicas



SBAC

**Sociedade
Brasileira de
Análises
Clínicas**



Consolidando o Futuro das Análises Clínicas no Brasil

Associe-se à SBAC

Tel: (21) 2187-0800
www.sbac.org.br
geral@sbac.org.br